

**Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad
antioxidante de los extractos de la flor de *Brownea macrophylla* obtenidos
por diferentes técnicas de aislamiento**

KAROL CARRILLO JAIMES

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Química
Bucaramanga
2017**

**Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad
antioxidante de los extractos de la flor de *Brownea macrophylla* obtenidos
por diferentes técnicas de aislamiento**

KAROL CARRILLO JAIMES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química

Directores:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph. D.

JAIRO R. MARTÍNEZ, Químico, Ph. D.

Co-director:

JÉSICA J. MEJÍA MEDINA, Química.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

Bucaramanga

2017

DEDICATORIA

*A Él, que me ha dado una vida llena de felicidad,
y me ha rodeado de hermosas personas. Porque Él conoce
el valor de este trabajo.*

*A Ella, pues nunca me ha dejado sola, protegiéndome
de todo y educándome con amor.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque me han dejado la herencia más importante y hermosa, a ellos solo tengo palabras de agradecimiento.

A mis hermanas porque han hecho de mí una mejor persona, y tengo la dicha de tener 5 madres.

A mi madrina, mi modelo, porque siempre inspiro en mí el deseo de realizarme y seguir mis sueños, gracias por acompañar cada uno de mis pasos.

A mis sobrinos que llenaron mi vida de sonrisas y muchas emociones, gracias por ser el motor de mi vida.

Al ángel que encontré desde el primer día de esta carrera, amiga, hermana, compañera, porque siempre serás luz en mi vida. Gracias por ofrecerme tu amistad incondicional. Para mí es un honor haber compartido juntas estos años de experiencias, viajes y sonrisas. Katerine siempre estaremos juntas, vamos por más logros.

A Roger, mi hermano, quien nunca me ha dejado sola, sin él muchas cosas hubiesen sido muy difíciles. Siempre nos unirá un enorme cariño, hermandad y amor.

A Jesi, porque en ella no solo encontré una co-directora/compañera, sino una mujer maravillosa que me enseñó, corrigió y vio en mí cosas buenas, a ella, querida amiga: nunca tendré como contribuirte todo lo que has hecho por mí.

A la Dra. Elena E. Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por todas sus enseñanzas en mi formación profesional, siempre gracias.

A todo el grupo de trabajo de CENIVAM y CROM-MASS, porque sin su colaboración este trabajo no sería posible.

A Lady por brindarme su amistad y ayudarme con este logro.

A Andrea, Jaz, Edison, Isidro y Jose, por ofrecerme su maravillosa amistad, a pesar de la distancia.

A Fausto, John, Juli, Kami, Migue, Yesica, Gus, Erika, Camilo T., Rossy, Anderson R. A. y Gloria, gracias por su colaboración, ayuda y sonrisas en este trayecto.

A las evaluadoras, la Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez y la Dra. Luz Ángela Carreño Díaz, por leer y evaluar este trabajo.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	15
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO DE REFERENCIA	18
1.1 Antecedentes	18
1.2 Marco teórico	21
1.2.1 Género <i>Brownea</i> y <i>Brownea macrophylla</i>	21
1.2.2 Antioxidantes	22
1.2.2.1 Clasificación de los AH, según su origen en el ser humano	22
1.2.2.2 Clasificación de los AH, según su mecanismo de acción	23
1.2.2.3 Clasificación de los AH, según su naturaleza	24
1.2.3 Compuestos fenólicos	27
1.3 Recolección y secado del material vegetal	30
1.4 Obtención de extractos	30
1.4.1 Dispersión de la matriz en fase sólida	30
1.4.2 Extracción con fluido supercrítico	31
1.4.3 Extracción con solventes	32
1.5 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno	32
1.6 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	32
1.7 Determinación del contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu	33
1.8 Caracterización de los compuestos y técnicas instrumentales	34
1.8.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	34
1.8.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	35
1.8.3 Espectroscopia ultravioleta-visible, método antocianinas monoméricas totales	35
2. METODOLOGÍA	37
2.1 Recolección y secado del material vegetal	37
2.2 Identificación botánica	37
2.3 Obtención de extractos	38
2.3.1 Reactivos	38
2.3.2 Dispersión de la matriz en fase sólida	39
2.3.3 Extracción con fluido supercrítico	39
2.3.4 Extracción con solventes	39

2.4	Evaluación de la actividad antioxidante por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno	41
2.5	Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	42
2.6	Determinación del contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu	43
2.7	Caracterización de los compuestos y técnicas instrumentales	43
2.7.1	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	43
2.7.2	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	44
2.7.3	Espectroscopia ultravioleta-visible: método antocianinas monoméricas totales	45
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
3.1	Identificación botánica	46
3.2	Análisis del estudio por espectroscopia UV-vis por el método antocianinas monoméricas totales a los extractos con solvente	46
3.3	Identificación por GC-MS de los compuestos extraídos por SFE	50
3.4	Análisis por LC-MS y UV-vis del extracto obtenido por solvente	52
3.5	Análisis por LC-MS y UV-vis de los compuestos obtenidos por MSPD	57
3.6	Determinación de la capacidad antioxidante y del contenido total de fenoles	62
4.	CONCLUSIONES	65
5.	RECOMENDACIONES	66
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	BIBLIOGRAFÍA	76
	ANEXO A	78
	ANEXO B	81
	ANEXO C	82
	ANEXO D	83
	ANEXO E	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria.....	24
Tabla 2. Clasificación de compuestos fenólicos.....	28
Tabla 3. Matriz de experimentos para el diseño experimental 2 ³ de la extracción con solvente.....	40
Tabla 4. Identificación taxonómica de <i>Brownea macrophylla</i>	46
Tabla 5. Valores del contenido total de antocianinas monoméricas (mg pg-3-glu/L) de los extractos hidro-etanólicos de flores de <i>B. macrophylla</i>	47
Tabla 6. Efectos de las variables de estudio y sus posibles combinaciones.....	47
Tabla 7. Identificación por GC-MS de compuestos en el extracto, obtenido con SFE, de flores de <i>B. macrophylla</i>	51
Tabla 8. Compuestos identificados por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, en el extracto hidro-etanólico aislado de flores de <i>B. macrophylla</i>	52
Tabla 9. Compuestos identificados por LC-ESI ⁺ -TOF-MS, en el extracto aislado por MSPD de flores de <i>B. macrophylla</i>	57
Tabla 10. Compuestos identificados en los extractos aislados de flores de <i>B. macrophylla</i>	61
Tabla 11. Capacidad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos de flores de <i>B. macrophylla</i>	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicaciones sobre el género <i>Brownea</i>	18
Figura 2. Países con publicaciones sobre el género <i>Brownea</i>	19
Figura 3. Flor de <i>Brownea macrophylla</i>	21
Figura 4. Estructuras de algunos AH sintéticos. A. BHA. B. BHT. C. Etoxiquina (E324).....	23
Figura 5. Estructura básica de un flavonoide y sus clases.....	29
Figura 6. Liofilizador de bandejas <i>Virtis Advance Plus</i> (New York, EE.UU.).....	37
Figura 7. Lector de microplacas <i>Turner Biosystems Inc., Modulus TM II</i>	42
Figura 8. Cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas (TOF), por medio de una interface ESI.....	44
Figura 9. Gráfica de superficie a temperatura constante en el nivel inferior (30 °C).....	49
Figura 10. Gráfica de superficie a temperatura constante en el nivel superior (50 °C).....	49
Figura 11. Representación gráfica del diseño 2^3 , con los valores del contenido de antocianinas monoméricas totales	50
Figura 12. Cromatograma del extracto con SFE de flores de <i>B. macrophylla</i> obtenido por GC-EI-MS	51
Figura 13. Cromatograma del extracto hidro-etanólico, obtenido de flores de <i>B. macrophylla</i> , por LC-ESI+-TOF-MS.....	53
Figura 14. Espectro de masas de la pelargonidina-3,5-diglucósido, obtenido por LC-ESI+-TOF-MS.....	54
Figura 15. Espectro UV-vis (190-650 nm) del extracto hidro-etanólico de flores de <i>B. macrophylla</i>	55

Figura 16 Cation flavilio.....	56
Figura 17. Espectro UV-vis de pelargonidina-3-soforósido-5-glucósido en pH 1.0 y pH 4.5.....	56
Figura 18. Cromatograma del extracto aislado, por MSPD, de flores de <i>B. macrophylla</i> , por LC-ESI ⁺ -TOF-MS.....	58
Figura 19. Espectro UV-vis (190-650 nm) del extracto de flores de <i>B. macrophylla</i> , obtenido por MSPD.....	59

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Espectros de masas de los compuestos identificados en el extracto por SFE de flores de <i>B. macrophylla</i>	78
ANEXO B: Espectros de masas de los compuestos identificados tentativamente en el extracto hidro-etanólico de flores de <i>B. macrophylla</i>	81
ANEXO C: Espectros de masas de los compuestos identificados tentativamente en el extracto por MSPD de flores de <i>B. macrophylla</i>	82
ANEXO D: Flavonoides identificados en el extracto hidro-etanólico de flores de <i>B. macrophylla</i>	82
ANEXO E: Flavonoides identificados en el extracto por dispersión de la matriz en fase sólida de flores de <i>B. macrophylla</i>	85

RESUMEN

TÍTULO: Estudio de la composición química y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de *Brownea macrophylla* obtenidos por diferentes técnicas de aislamiento*

AUTORA: Karol Carrillo Jaimes**

PALABRAS CLAVE: *Brownea macrophylla*, antioxidantes, compuestos fenólicos, ORAC, ABTS⁺, Folin-Ciocalteu, UV-vis, LC-MS y GC-MS.

DESCRIPCIÓN:

Algunos colorantes y antioxidantes sintéticos empleados en la industria alimenticia y cosmética han generado una problemática debida a su impacto ambiental y a los efectos nocivos sobre la salud humana, esto ha conducido a la búsqueda de antioxidantes y/o colorantes de origen natural, que no afecten el ecosistema, ni perjudiquen el bienestar de las personas. En las flores se han encontrado colorantes con posible actividad antioxidante, y siendo Colombia uno de los principales países de exportación de flores, se estudió una flor muy llamativa y poco estudiada, *Brownea macrophylla* (Familia Fabaceae).

En este trabajo, se determinó la actividad antioxidante por diferentes ensayos (ORAC y ABTS⁺), de tres extractos obtenidos por SFE, MSPD y SE, de flores de *Brownea macrophylla*, se identificaron metabolitos secundarios en estos extractos y se halló el contenido total de fenoles por el método Folin-Ciocalteu. Entre los compuestos identificados en los extractos de flores de *Brownea macrophylla*, se encontraron compuestos de naturaleza lipídica, como los fitoesteroles; también, se identificaron compuestos flavonoides, entre ellos, las antocianinas, a las cuales se les atribuye el color rojo-naranja de la flor. Los extractos obtenidos por MSPD y SE, presentaron una actividad antioxidante mayor en comparación con sustancias de referencia (BHT y α -tocoferol) usadas.

Para la extracción con solvente, se monitorearon algunas variables de extracción (relación del solvente, acidez y temperatura), con el fin de encontrar, cuáles variables e interacciones son significativas en la obtención del contenido de antocianinas monoméricas totales. Se encontraron que las tres variables en estudio y sus interacciones son altamente significativas en la extracción de antocianinas.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Dra. Elena Stashenko y Dr. Jairo René Martínez.

ABSTRACT

TÍTULO: Study of the chemical composition and evaluation of the antioxidant capacity of extracts *Brownea macrophylla*'s flower, obtained by different isolation techniques*

AUTHOR: Karol Carrillo Jaimes**

KEYWORDS: *Brownea macrophylla*, antioxidants, phenolics compounds, ORAC, ABTS^{•+}, Folin-Ciocalteu, UV-vis, LC-MS y GC-MS.

DESCRIPTION:

Some dyes and synthetic antioxidants, used in the food and cosmetic industries, have generated a problem due to the environmental impact and the harmful effects on human health, that led us to look for antioxidants and / or colorants of natural origin that do not affect the ecosystem or harm human health. The flowers possess pigments with antioxidant activity; and as Colombia is one of the countries, which export flowers, we studied a very attractive and very little studied, flower of *Brownea macrophylla* (Fabaceae Family).

Antioxidant activity was determined by different assays (ORAC and ABTS^{•+}) of three *Brownea macrophylla* flower extracts (SFE, MSPD and SE). The secondary metabolites were identified in these extracts and total phenol content was found by the Folin-Ciocalteu method. Among the compounds identified in the *Brownea macrophylla* flower extracts, e.g., phytosterols, were also identified flavonoid compounds as anthocyanins, to which the flower color is attributed. The extracts obtained by MSPD and SE, had higher antioxidant activity compared with reference substances used (BHT and α -tocopherol).

Some variables (solvent ratio, acidity and temperature) were studied in SE, order to find which of them are significant in obtaining the higher amount of total monomeric anthocyanin. It was found that these three variables under study and their interactions are highly significant in the anthocyanin extraction.

*Proyect to degree

**Science Faculty, Chemistry School, Directors: Dr. Elena Stashenko y Dr. Jairo René Martínez.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Actividad antioxidante
AAPH	<i>2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride</i> (Hidrocloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano))
ABC	Área bajo la curva
ABTS⁺	Catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AH	Antioxidante
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza)
AT	<i>Agilent Technologies</i>
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> (Butilhidroxitolueno)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
ESI-MS/MS	<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> (Ionización por electronebulización acoplado a espectrometría de masas tándem)
FCR	<i>Folin-Ciocalteu Reagent or Folin's Phenol Reagent</i> (Reactivo de Folin-Ciocalteu)
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HPLC-DAD-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry with Diode Array Detector</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas y al detector con arreglo de diodos)
i.e.	<i>Id est</i> (Es decir)
IRL	Índice de retención lineal
LC-MS	<i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de matriz en fase sólida)
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales oxígeno)
pg-3-glu	Pelargonidina-3-glucósido
SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
t_R	Tiempo de retención, min
Trolox[®]	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i> (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)
UV-vis	<i>Ultraviolet-visible</i> (Ultravioleta visible)

INTRODUCCIÓN

El género *Brownea* (Familia Fabaceae) cuenta con aproximadamente 25 especies vegetales adaptadas a climas tropicales; es nativo de Sudamérica [1]. Algunas de estas especies han sido usadas en la medicina tradicional para curar los efectos producidos por mordeduras de serpientes [2]. Los nativos de las regiones, donde prolifera este género, suelen llamar a las especies de diferentes formas, como *Brownea rosademonte*, árbol Palo de Cruz o Rosa de Monte [1]. Aunque este género no ha sido muy estudiado, la mayoría de los reportes científicos muestran la capacidad de los extractos acuosos e hidro-etanólicos de diferentes partes del árbol de *Brownea rosademonte*, para neutralizar el veneno de diferentes especies de serpientes [2, 3]. Otro de los estudios realizados a este género, es sobre la fenología de *Brownea Palo de Cruz*, donde se mostró que el clima cálido es apropiado para su desarrollo [1]. Algunas de las especies de este género son *B. ariza*, *B. gradiceps*, *B. capitella* y *B. macrophylla*; estas especies guardan una característica en común que las hace muy atractivas: su flor. Las flores de estas especies son de colores que van del naranja al rojo brillante, son grandes, llamativas, se usan en infusiones para tratar hemorragias menstruales [4] y, hasta hoy en día, han sido poco estudiadas.

La investigación realizada en este trabajo, tuvo como base la problemática que existe con los colorantes y antioxidantes sintéticos, los cuales han generado algunos efectos nocivos sobre la salud humana [5, 6]. Por ello, actualmente, se buscan colorantes de origen natural, con propiedades antioxidantes, para ser incorporados en productos de uso diario. Las flores tienen la capacidad de sintetizar pigmentos y además con propiedades que benefician y cuidan la planta. Las flores pueden ser materia prima para la obtención de colorantes naturales, que otorguen a un producto, tanto el color, como algunas de las propiedades que dichos compuestos usan para proteger y preservar la especie vegetal.

Este trabajo se enfocó en el estudio de la composición química de diferentes extractos (etanólicos, fluido supercrítico y por dispersión de la matriz en fase sólida) de la flor de *B. macrophylla*, y en la determinación de la actividad antioxidante de cada uno de los extractos. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto de flores de *B. macrophylla* y obtenidos por extracción con fluido supercrítico (SFE), se identificaron por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y los compuestos encontrados en los extractos con solvente (SE) y por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), se identificaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Se evaluó la actividad antioxidante de cada uno de los extractos

mediante los ensayos de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) y decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, y se determinó el contenido fenólico para cada extracto, por medio del ensayo Folin-Ciocalteu.

Cabe mencionar que, hasta el momento no se encuentran estudios sobre la composición química de extractos de la flor de *B. macrophylla*.

En los extractos (MSPD y SE) de flores de *B. macrophylla* se encontraron compuestos fenólicos, como flavonoles, flavanoles y antocianinas, pertenecientes a la familia de flavonoides, a los cuales se les atribuye la capacidad antioxidante que presentaron los extractos. En contraste, en el extracto obtenido con fluido supercrítico, no se identificaron flavonoides, aunque se aislaron otros compuestos, e.g., fitoesteroles.

Algunos de los resultados de esta investigación fueron divulgados en el IV Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales (COLAPLAMED 2016), y en el V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales (CIPNat 2016) en modalidades póster y ponencia oral.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 Antecedentes

Con el fin de conocer qué investigaciones se han realizado sobre el género *Brownea*, se llevó a cabo una búsqueda, en la base de datos **Scopus (Elsevier)**, enfocada en los estudios realizados sobre este género; la ecuación de búsqueda empleada fue TITLE-ABS-KEY (*Brownea*).

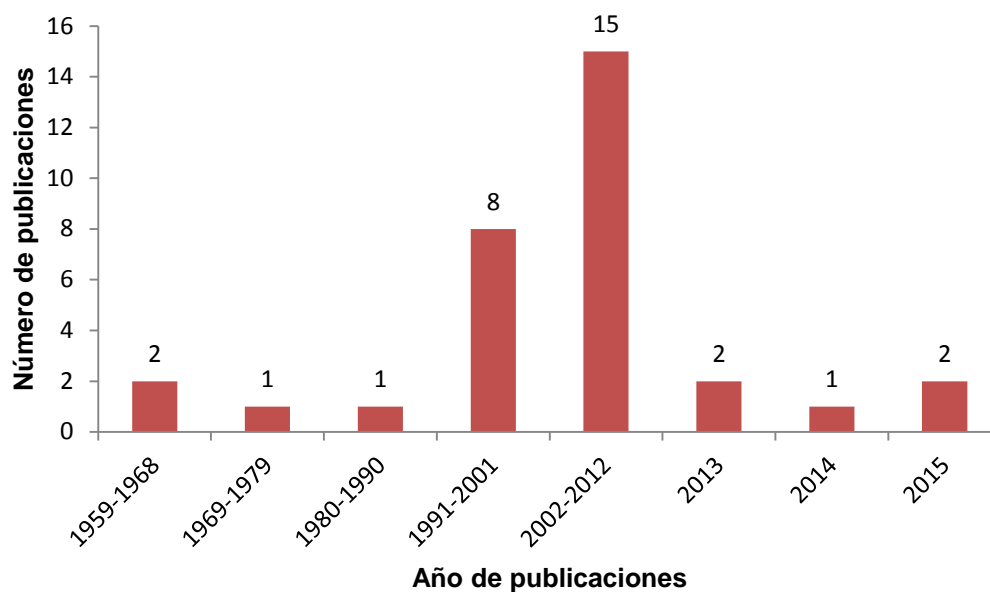


Figura 1. Número de publicaciones sobre el género *Brownea*. Periodo de búsqueda: 1954-2016. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Brownea*). Fecha de consulta: 5 de octubre de 2016.

En la **Figura 1**, se muestra el número de publicaciones acerca del género *Brownea*, en el período 1959-2016. No se registran resultados en años anteriores a 1959. Se puede apreciar, que el estudio sobre este género no ha tenido un gran progreso: el número máximo de publicaciones en una década (2002-2012) correspondió a 15 trabajos. En 2016, hasta el momento (octubre de 2016) no se registran trabajos publicados.

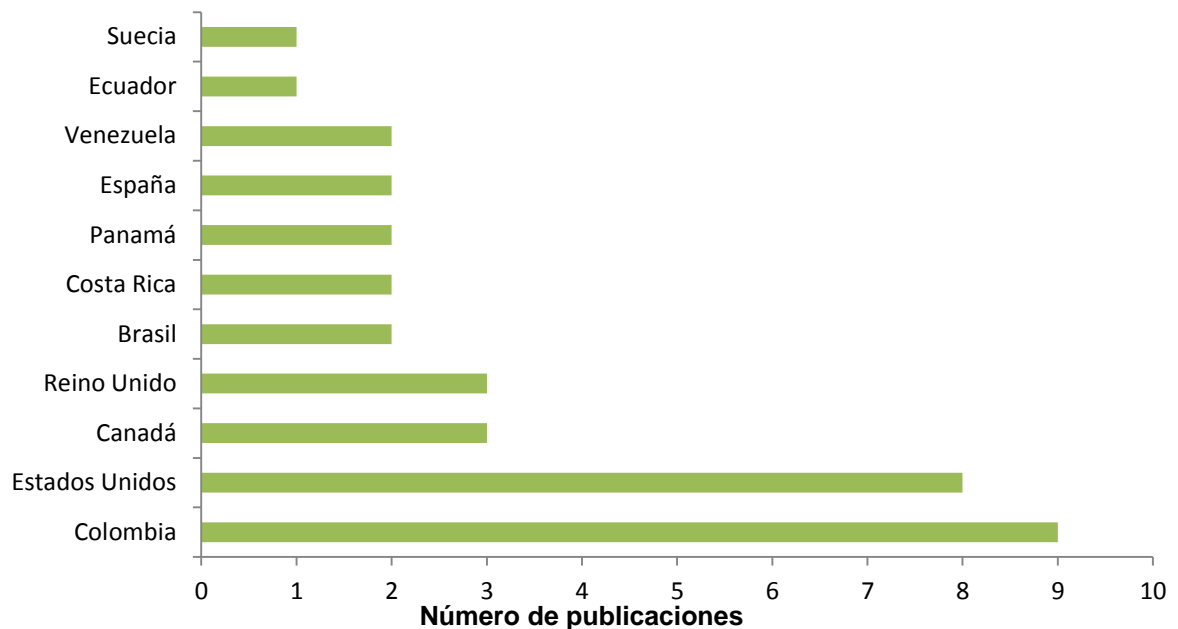


Figura 2. Países con publicaciones sobre el género *Brownea*. Periodo de búsqueda: 1954-2016. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Brownea*). Fecha de consulta 5 de octubre de 2016.

En la **Figura 2**, se muestran los países, en donde se han realizado investigaciones sobre el género *Brownea*. La lista la encabeza Colombia con 9 publicaciones. Se puede apreciar que solo hay 11 países con trabajos sobre este género y, la mayoría son de América.

En la base de datos *Scopus (Elsevier)*, con la ecuación de búsqueda [TITLE-ABS-KEY (*Brownea*)], durante el periodo 1954-2016, se encontró que se han realizado 32 trabajos sobre *Brownea*; las investigaciones realizadas en Colombia son las más citadas en comparación con las producidas en otros países.

Otero, R. *et al.* (2000) [7] determinaron que el extracto etanólico de la raíz de *Brownea rosa-de-monte*, tiene una actividad neutralizante ante el veneno inyectado a ratones de la serpiente *Bothrops atrox* que habita en las regiones del Chocó y Antioquia.

Núñez, V. *et al.* (2004) [2] mostraron que el extracto etanólico de la raíz de *Brownea rosa-de-monte* tiene una actividad neutralizante contra los venenos de tres especies diferentes de serpientes, *Lachesis muta*, *Crotalus durissus* y

Micrurus mipartitus, inyectados por vía intraperitoneal a ratones; los extractos fueron suministrados por medio intravenoso.

Núñez, V. *et al.* (2004) [3] evaluaron en ratones, la capacidad neutralizante y coagulante del extracto etanólico de la corteza del tronco de *Brownea rosa-de-monte*, frente al veneno de la serpiente *Bothrops asper*.

Gil, J. F. *et al.* (2009) [8] caracterizaron, aislaron y midieron la actividad citotóxica y la capacidad anticancerígena de dos flavonoides (quercitrina y quercetina) contenidos en el extracto etanólico de las hojas frescas de *Brownea ariza*.

Lizcano, L. J. *et al.* (2010) [9] compararon el contenido de flavonoides, la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles del extracto acuoso de la corteza de varias especies vegetales, entre ellas, *Brownea rosa-de-monte*.

Mack-Wen, V. L. *et al.* (2010) [10] hallaron que el extracto etanólico de la corteza de *Brownea ariza* tiene una capacidad inhibitoria y coagulante sobre el veneno de la serpiente *Bothrops asper*.

Sampedro, A. *et al.* (2011) [11] realizaron un estudio sobre las especies vegetales más importantes en la localidad de Sucre (Colombia), para incrementar el ecoturismo, y encontraron que *Brownea ariza* es una de las especies más representativas de su género por la belleza de sus flores.

Lizcano, L. J. *et al.* (2012) [12] mostraron los resultados de la peroxidación lipídica inhibitoria, actividad antimicrobiana, el contenido total de fenoles y de flavonoides de extractos acuosos de raíces de *Brownea rosa-de-monte*, y encontraron como componentes mayoritarios catequina, epicatequina, quercetina y kaempferol.

Gómez, A. *et al.* (2012) [1], publicaron los resultados sobre el seguimiento de crecimiento a un cultivo de árboles de *Brownea rosa-de-monte*; allí, mostraron cómo el clima influye sobre el crecimiento del árbol, la fructificación y en la floración, y concluyeron que, con el clima cálido y con precipitación baja de lluvia, los árboles mostraron un incremento en el número de flores y frutos.

Pereira, B. *et al.* (2015) [13] evaluaron la capacidad de coagulación en la sangre, de extractos acuosos de flores de *B. grandiceps*; encontraron que los extractos presentaron taninos, saponinas, glucósidos, alcaloides, flavonoides y cumarinas. Concluyeron que el extracto de la flor de *B. grandiceps* es útil para incrementar la coagulación de la sangre, debido a la presencia de fibronectina.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Género *Brownea* y *Brownea macrophylla*

El género *Brownea* tiene aproximadamente 25 especies [14]. Algunas de ellas se confunden con *B. macrophylla*, ya que poseen características similares; entre ellas, se encuentran: *B. grandiceps*, *B. capitella*, y *B. ariza*. Estas especies, junto con *B. macrophylla*, poseen flores llamativas de colores cálidos, hojas alargadas y, también, son árboles de gran altura [15]. *B. macrophylla* se conoce como “*B. rosa-de-monte*”, “*Palo de Cruz*”, “*Soplo Rojo*”, “*Rosa de Venezuela*”, entre otras.

El crecimiento de *B. macrophylla*, se favorece en climas cálidos secos, y la etapa de floración se da cuando se presenta poca precipitación de lluvias [1]. *B. macrophylla* pertenece al reino Plantae y a la familia Fabaceae.

B. macrophylla es un árbol que puede llegar a medir entre 10 y 25 m de altura [1], con un diámetro entre 40-60 cm, no hay claridad sobre el origen de esta especie, ya que *F. D. Rauch et al.* (2009) [15] mencionaron que Colombia, Venezuela y Panamá son los países de los cuales esta especie es nativa, pero *J. Morera et al.* (1995) [16] aseguraron que es Venezuela. Otros autores [13, 14], cuando tratan del origen, se refieren a los países del norte de Sudamérica. Esta especie posee hojas alargadas puntiagudas. Lo más llamativo de esta planta son sus flores (Véase **Figura 3**); crecen a lo largo del tronco principal y en algunas ramificaciones, pueden llegar a medir entre 5-10 cm de largo, son de color naranja a rojo y el árbol llega a tener de 30 a 50 flores, por inflorescencia [14].



Figura 3. Flor de *Brownea macrophylla*. Foto tomada por la autora. Fecha: 15 de enero del 2016. Lugar, CENIVAM-UIS, Bucaramanga.

1.2.2 Antioxidantes

Un antioxidante (AH), se define como una sustancia que, en bajas concentraciones, retrasa significativamente o previene la oxidación de otras moléculas [17]. Algunos antioxidantes se producen en el cuerpo humano para cumplir con las funciones fisiológicas necesarias. También pueden ser sintetizados para su incorporación en alimentos, productos de aseo y/o cosméticos, con el fin de alargar la vida útil y evitar su deterioro. Estos últimos son llamados AH sintéticos [18]. Los AH sintéticos empleados en algunos productos de la industria han generado una problemática debido al efecto negativo sobre el medio ambiente y a los efectos nocivos sobre la salud humana [5, 6, 18].

Los radicales libres son átomos o moléculas, caracterizadas por poseer uno o más electrones desapareados. Se forman como intermedios de reacciones, a partir de la ruptura homolítica de una molécula; son muy inestables, reactivos y de vida media muy corta [19]. En el organismo, los radicales libres oxidan constantemente otras moléculas, acelerando el envejecimiento y la proliferación de enfermedades; también son responsables de la disminución de los ácidos grasos insaturados (oxidación lipídica).

Muchos AH sintéticos y radicales libres han sido fuente de enfermedades [18, 20]. Esto promueve la búsqueda de AH de origen natural, que no afecten el ecosistema, ni perjudiquen el bienestar de las personas al consumir productos que incorporen estas sustancias.

Los antioxidantes pueden clasificarse según su origen en el ser humano, mecanismo de acción y naturaleza.

1.2.2.1 Clasificación de los AH, según su origen en el ser humano

Algunos antioxidantes se bio-sintetizan en el organismo para el buen funcionamiento del mismo; estos se llaman AH endógenos. Pero solo los AH endógenos no son suficientes para una vida saludable. También existen algunos que deben ser introducidos por medio de la dieta alimenticia; éstos se conocen como AH exógenos.

Los AH endógenos son aquellos que no son requeridos en la dieta, ya que se sintetizan en el cuerpo. Entre los más conocidos, se encuentran el glutatión, la catalasa, glutatión peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD), el ubiquinol,

entre otros [21, 22]. Todos cumplen funciones antioxidantes importantes para el desarrollo del organismo.

Los AH exógenos son los compuestos que ingresan al organismo solo a través de la dieta, y son necesarios para complementar las funciones de los AH endógenos. Los más comunes y necesarios son: ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), algunos polifenoles y minerales como el hierro, zinc, selenio, que aunque están presentes en el cuerpo, es necesaria su ingesta adicional. Los minerales no tienen alguna acción AH por si solos; sin embargo, son requeridos para la actividad de algunas enzimas antioxidantes [21, 22].

1.2.2.2 Clasificación de los AH, según su mecanismo de acción

Los antioxidantes también se pueden clasificar según el mecanismo de protección que ejercen hacia la oxidación lipídica y durante el estrés oxidativo, así: 1). Antioxidantes primarios; 2). Antioxidantes secundarios y 3). Antioxidantes terciarios [23].

Antioxidantes primarios: Son AH que funcionan como aceptores de los radicales e impiden y retrasan la oxidación lipídica y el estrés oxidativo. Este tipo de protección es la empleada por los AH enzimáticos. La mayoría de los AH primarios son mono o polihidroxifenoles, la sustitución con un grupo donador de electrones en las posiciones *orto/para* con respecto al hidroxilo del fenol aumenta la actividad antioxidante de los compuestos; como ejemplo de ello, está el BHA (2-*terc*-butil-4-hidroxianisol) (Véase **Figura 4.A**) [23].

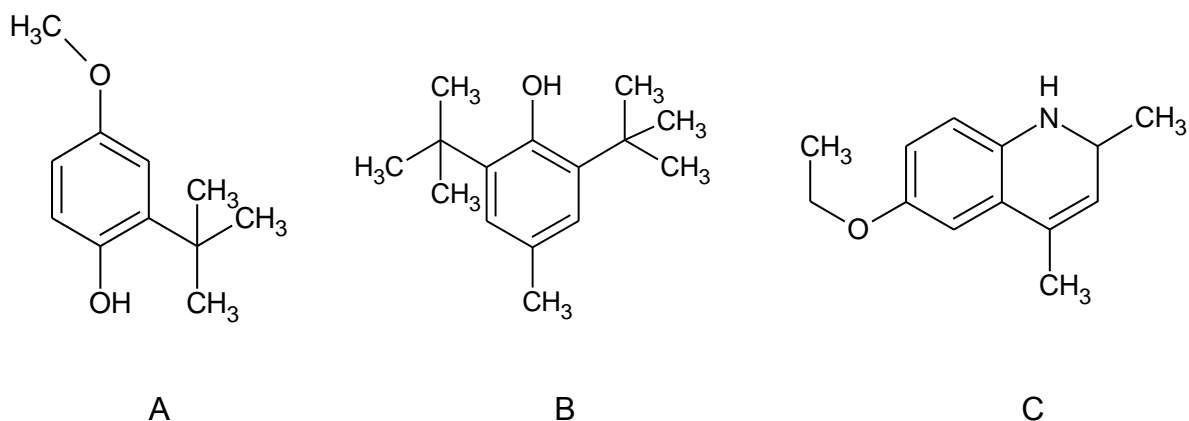


Figura 4. Estructuras de algunos AH sintéticos. **A.** BHA. **B.** BHT. **C.** Etoxiquina (E324).

Antioxidantes secundarios o preventivos: Los AH secundarios proporcionan hidrógeno a los AH primarios y/o descomponen los hidroperóxidos a especies no radicalarias. La diferencia con los AH primarios, es que los secundarios no estabilizan los radicales libres, sino que proporcionan una especie de “apoyo” a los primarios. Un ejemplo de estos son los ácidos cítrico, succínico, tartárico, ascórbico y algunos carotenoides [23].

Antioxidantes terciarios: Son algunos AH que reparan el daño en biomoléculas perjudicadas por radicales libres. Algunos AH presentan más de un mecanismo de acción. Se conocen como AH de función múltiple [23].

1.2.2.3 Clasificación de los AH, según su naturaleza

Otra posible clasificación de los antioxidantes es según su naturaleza, es decir, si el AH fue creado artificialmente (sintético), o fue extraído de una especie vegetal o animal; estos últimos AH se llaman antioxidantes naturales.

Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos se sintetizan por los humanos, y se usan para la preservación de algunos productos, estabilización de grasas, aceites y conservación de alimentos. Existen muchos compuestos antioxidantes. Sin embargo, solo algunos se incorporan en los alimentos, debido a algunas normas de seguridad. Los antioxidantes fenólicos sintéticos están sustituidos con grupos alquilo para mejorar la solubilidad en grasas y aceites [23]. En la **Tabla 1**, se muestran algunos antioxidantes de uso industrial, entre ellos, el BHT (Véase **Figura 4.B.**), frecuentemente usado en las industrias alimenticia y cosmética, y la etoxiquina (Véase **Figura 4.C.**).

Tabla 1. Antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria.

AH Sintético	Fórmula molecular	Uso
Etoxiquina (E324)	$C_{14}H_{19}NO$	Industria alimenticia de animales. Pesticida de frutas ^[24] .
BHA (E320)	$C_{11}H_{16}O_2$	Industrias alimenticia y cosmética ^[23] .
BHT (E321)	$C_{15}H_{24}O$	Industrias alimenticia y cosmética ^[23] .
TBHQ (E319)	$C_{10}H_{15}O_2$	Industria alimenticia ^[23] .
Malato de potasio (E351)	$C_4H_4K_2O_5$	Industria alimenticia ^[25] .
Estereato ascorbilo (E305)	$C_{24}H_{42}O_7$	Industria alimenticia ^[26] .

Antioxidantes naturales

Un antioxidante natural es aquel que, extraído de una especie vegetal o animal, es capaz de proteger un sistema biológico de reacciones y procesos de oxidación; puede ser un flavonoide, compuesto fenólico o carotenoide, que son los AH que se encuentran, de forma más frecuente, en las plantas [5, 6, 27]. En los últimos años, se ha presentado un aumento de investigaciones para buscar antioxidantes naturales, con el fin de reducir el consumo de antioxidantes sintéticos en los alimentos, debido a los efectos negativos sobre la salud que estos puedan tener [23]. Entre los antioxidantes naturales, pueden encontrarse las siguientes familias de compuestos:

- **Minerales**

Los minerales aquí descritos no tienen alguna acción AH por si solos, aunque, se requieren para la actividad de algunas enzimas antioxidantes [21, 22]. El zinc es un elemento químico esencial para los seres humanos, interviene en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos. El zinc se considera como un antioxidante, porque puede proteger la piel y los músculos del cuerpo contra el envejecimiento. También, se supone que es beneficioso para el sistema inmunológico humano, y su deficiencia puede ser perjudicial para prácticamente todas las partes del cuerpo humano [28]. El selenio es un elemento químico, que se usa con diversos fines, ayuda a neutralizar los radicales libres y estimula el sistema inmunológico. Además, es un componente de los antioxidantes glutatión peroxidasa y la tiorredoxina reductasa [29].

- **Vitaminas**

Entre el grupo de las vitaminas, se encuentra un antioxidante natural muy conocido, la vitamina C. La vitamina C (enantiómero L del ácido ascórbico) es un suplemento esencial para el ser humano, debido a que no se sintetiza por el organismo; por eso, su presencia en la dieta es indispensable. La ausencia de esta vitamina inhibe la producción de colágeno y produce una enfermedad llamada escorbuto [30]. El ácido ascórbico puede reducir algunos radicales. Un ejemplo, es la donación de un átomo de hidrógeno al radical tocoferilo y luego la regeneración del tocoferol, que se observa comúnmente en los sistemas biológicos. El ácido ascórbico, sus sales y sus ésteres se utilizan como antioxidantes en algunos frutos secos y en la preservación de la carne [23]. La vitamina E es un grupo de compuestos que incluyen tocoferoles y tocotrienoles. Se puede encontrar en el aceite de

germen de trigo, de girasol y de cártamo. Como antioxidante soluble en grasa, detiene la producción de especies reactivas de oxígeno que se forman cuando la grasa se somete a oxidación. Gracias a su solubilidad en grasa, se incorpora en las membranas celulares, lo que las protege del daño oxidativo. La vitamina E también se ha usado como un antioxidante comercial en polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE, por sus siglas en inglés *Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene*), empleado en implantes de cadera y de rodilla para ayudar a resistir la oxidación del material [31].

- **Carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos orgánicos pertenecientes al grupo de los tetraterpenos (C_{40}), que se encuentran en plantas, algas, algunos hongos y bacterias. Los carotenoides que contienen átomos de oxígeno son llamados xantofilas. Los demás constituyen el grupo de los llamados carotenos. Los carotenoides tienen colores característicos, desde amarillo, naranja, hasta rojo oscuro; su color se encuentra directamente relacionado con su estructura. Si el número de enlaces dobles conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también se incrementa, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Los carotenoides son responsables de la coloración en los tomates, zanahorias, langostas y salmón [32]. Los carotenoides pueden actuar como antioxidantes primarios al atrapar radicales libres. En los alimentos, los carotenoides suelen operar como antioxidantes secundarios; sin embargo, algunos carotenoides neutralizan radicales libres e intervienen como antioxidantes de ruptura de cadena [23].

- **Tocoferoles**

Los tocoferoles son varios compuestos orgánicos conformados por varios fenoles metilados. Los tocoferoles y tocotrienoles son compuestos antioxidantes naturales que se encuentran mayoritariamente en diferentes tejidos. Son solubles en grasas y se encuentran en abundancia en alimentos derivados de aceites vegetales, por ejemplo, en aceite de maíz y soja. La actividad antioxidante de los tocoferoles se debe, principalmente, a que eliminan los radicales peroxilos, interrumpiendo así la propagación en cadena de los radicales. Los productos de descomposición de los tocoferoles (durante la oxidación térmica) pueden oxidarse lentamente y liberar tocoferol, que puede actuar como un antioxidante [23].

- **Polifenoles**

Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios orgánicos encontrados en plantas, caracterizados por la presencia de más de un grupo hidroxilo y fenoles por molécula. Los polifenoles se subdividen en taninos hidrolizables y taninos condensados. Entre estos, los ácidos fenólicos y derivados polifenólicos se encuentran presentes de forma natural, son antioxidantes del tipo hidrófilo-hidrófobo. En los alimentos, estos compuestos polifenólicos actúan como captadores de radicales o quelantes de metales, y algunos desempeñan un papel multifuncional. Numerosas plantas y sus partes, han sido identificadas como fuentes de ácidos fenólicos, flavonoides y compuestos similares [23].

1.2.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se definen como sustancias que tienen uno o más anillos aromáticos, con uno o más grupos hidroxilo, y poseen sustituyentes diferentes a los de los grupos hidroxilo, por ejemplo, heteroátomos como el oxígeno (Véase **Figura 5**). En la naturaleza se encuentran más de 8000 compuestos fenólicos, los cuales se pueden clasificar según su número y posición de átomos de carbono [33]. En la **Tabla 2**, se muestra una clasificación de los compuestos fenólicos.

Tabla 2. Clasificación de compuestos fenólicos [34].

Nombre		Esqueleto	Ejemplo
Fenoles sencillos		C ₆	Catecol
Ácidos fenólicos		C ₆ -C ₁	Ácido gálico
Ácidos cinámicos		C ₆ -C ₃	Ácido cafeico
Cumarinas		C ₆ -C ₃	Dicumarol
Xantonas		C ₆ -C ₁ -C ₆	Mangiferina
Estilbenos		C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol
Flavonoides	Flavonas	C ₆ -C ₃ -C ₆	Luteolina
	Flavonoles		Quercetina
	Flavanoles		Dihidroquercetina
	Flavanonas		Naringenina
	Flavanoles		Catequina
	Chalconas		Chalconaringenina
Antocianinas/antocianidina			Pelargonidina
Lignanós		(C ₆ -C ₃) ₂	Enterodiol
Ligninas		(C ₆ -C ₃) _n	Lignina
Taninos		(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Ácido tánico

Los fenoles y los polifenoles desempeñan importantes funciones durante el metabolismo secundario de las plantas. Algunos ejemplos de ello son: la regulación de hormonas de crecimiento, la protección contra la radiación (UV), la coloración para fomentar la atracción de polinizadores, la prevención de infecciones microbianas, entre otras funciones [35]. A diferencia de los fenoles sencillos, los polifenoles son moléculas un poco más grandes, depositadas en las vacuolas de las células. Los compuestos fenólicos se encuentran de forma libre o como glucósidos, en todas las partes de la planta [36].

Las antocianinas, como otros flavonoides, actúan como neutralizadores de especies oxidantes, por ejemplo, el anión superóxido, radicales peroxilo e hidroxilo [35]. También, reaccionan con iones metálicos y, por lo tanto, indirectamente disminuyen la producción de radicales hidroxilo. Algunos flavonoides poseen alta actividad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anticoagulante, antibacteriana, antitumoral, antialérgica, antiinflamatoria o de inhibición de virus. Por esto es tan recomendada su presencia en la dieta [37]. Algunos polifenoles se utilizan tradicionalmente como colorantes. Por ejemplo, en la India, la cáscara de granada, con un alto contenido de taninos y otros polifenoles, o su jugo, se emplea en el teñido de tejidos [35].

Estructura básica de un flavonoide	
Flavonas:	En las posiciones 2 y 3: doble enlace, en la posición 4: grupo carbonilo.
Flavonoles:	En las posiciones 2 y 3: doble enlace, posición 3: grupo hidroxilo, posición 4: grupo carbonilo.
Flavanoles:	Posición 3: grupo hidroxilo.
Flavanonas:	En la posición 4: grupo carbonilo.
Flavanonoles:	Posición 3: grupo hidroxilo, posición 4: grupo carbonilo.
Antocianidina:	Posiciones 1 y 2: doble enlace; posición 3: grupo hidroxilo; posiciones 3 y 4: doble enlace.

Figura 5. Estructura básica de un flavonoide y sus clases. La descripción se hace respecto al anillo C. Clasificación tomada de Robards, K. *et al.* (1999) [34].

1.3 Recolección y secado del material vegetal

El material vegetal (flores), se recolectó en el jardín del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, en la Universidad Industrial de Santander.

Para lograr identificar los compuestos presentes en los extractos, es necesario encontrar una manera en que los flavonoides no se alteren durante los procesos de extracción y almacenamiento; las antocianinas se degradan por un tratamiento térmico, exposición a la luz y reaccionan fácilmente con oxígeno y otros fenoles [38]. Otro factor que influye en la estabilidad de las antocianinas es la presencia de agua; así como los microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras y mohos dependen de la actividad del agua para su crecimiento [39], la degradación de las antocianinas está relacionada con la presencia agua [40]. Jiménez, N. *et al.* (2012) [41] concluyeron en su investigación, que la reducción de la actividad del agua tuvo un efecto positivo en la estabilidad de las antocianinas; por este motivo, fue necesario usar el método de liofilización como parte del proceso de obtención de extractos.

La liofilización es un proceso de tres etapas: (1) congelación, (2) deshidratación y (3) conservación de la muestra, sin alterar su composición química; la muestra liofilizada no requiere almacenamiento a temperaturas bajas. En este proceso, el agua presente en la muestra se sublima en un paso. La liofilización se usa en las industrias alimenticias y farmacéuticas para conservar los alimentos y medicamentos libres de microorganismos [42].

1.4 Obtención de extractos

1.4.1 Dispersión de la matriz en fase sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés), es una técnica de extracción, y fraccionamiento de sólidos, semi-sólidos o muestras viscosas, que busca el aislamiento de analitos presentes en las células de tejidos vegetales o animales. Tiene un porcentaje de extracción alto, gracias al uso de un adsorbente, dispersante y un solvente de elución; además tiene la capacidad de eluir un compuesto o familia de compuestos con una cantidad de muestra pequeña (0,2 g) [43, 44].

En la mayoría de ocasiones, como fase sólida se usa sílice unida a C₁₈. De esta manera, la dispersión, extracción de la muestra y limpieza se llevan a cabo simultáneamente. Como agente dispersante, se emplean solventes orgánicos volátiles, y como solvente de elución, algunos alcoholes [44]. Este método se

emplea en la extracción de sustancias orgánicas, para el análisis de fármacos, contaminantes y pesticidas, a partir de muestras de alimentos, ambientales, entre otras. Los extractos obtenidos por esta técnica pueden ser analizados por cromatografía líquida o gaseosa acoplada a espectrometría de masas [45].

Zhang, H. *et al.* (2014) [46] emplearon la dispersión de la matriz en fase sólida como método de extracción de flavonoides en flores de *Chrysanthemum morifolium*; lograron identificar rutina, catequina, quercetina, kaempferol, apigenina, luteolina, naringenina y ácido ferúlico.

Herrero, M. *et al.* (2012) [47] estudiaron diferentes polifenoles en frutos y flores usadas en la industria alimenticia, aplicando diferentes técnicas de extracción, entre ellas, MSPD.

Las siguientes son las principales ventajas de la extracción por MSPD: que requiere pequeña cantidad de muestra y solventes, es rápida, económica, puede ser llevada a cabo bajo condiciones de extracción suaves (temperatura ambiente y la presión atmosférica); proporciona un rendimiento aceptable y se puede modificar su selectividad [43-45].

1.4.2 Extracción con fluido supercrítico

La extracción con fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés), es una técnica que usa un fluido, como solvente bajo presión y temperatura por encima de su punto crítico; en esta región, los fluidos tienen una mayor interacción con la muestra, penetran más fácilmente en los poros de la matriz y aumentan su solubilidad [48]. La baja tensión superficial que poseen estos fluidos permite su ingreso a través de los poros de matrices heterogéneas, lo que reduce tiempos de extracción y aumenta los rendimientos [49].

El solvente que se utilizó en este trabajo fue el dióxido de carbono (CO₂), ya que logra llegar al estado supercrítico a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, lo que evita la degradación e isomerización de los analitos. También, es un gas fácil de comprimir, no inflamable, no tóxico y de bajo costo [50].

El CO₂, tiene afinidad con moléculas de bajo a mediano peso molecular, apolares o de polaridad media; por ende, es habitual encontrar terpenos, algunos ácidos grasos y compuestos termolábiles en extractos de material vegetal con fluido supercrítico [48].

Li, S. *et al.* (2013) [51] reportaron la identificación de algunas antocianinas, entre ellas, delfinidina, peonidina, malvidina, cianidina-3-glucósido, entre otras, en

extractos de pétalos de flores de *Chaenomeles nisinensis*, usando como técnica de obtención la extracción con fluido supercrítico.

1.4.3 Extracción con solventes

La extracción con solventes (SE, por sus siglas en inglés *Solvent Extraction*) orgánicos es un tipo de extracción sólido-líquido que permite extraer una serie de compuestos a partir de una muestra sólida, por medio de diferentes solventes o sus mezclas. Durante el proceso, la muestra se sumerge en un solvente con el fin de solubilizar uno o más compuestos, dependiendo de su solubilidad. Se pueden aislar compuestos de polaridad alta, media o apolares, según el solvente usado [52]. Este método de extracción, también se aplica en la obtención de aceites vegetales [53].

1.5 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno

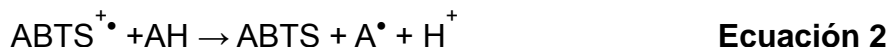
Entre los ensayos para la determinación de la capacidad antioxidante, se encuentra el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Este procedimiento se usa frecuentemente en la determinación de la capacidad antioxidante en alimentos [54]; el ensayo mide la disminución de fluorescencia de la fluoresceína, al reaccionar con los radicales generados por el AAPH, en presencia de un antioxidante (AH). La función del AH es proteger la fluoresceína, transfiriéndole átomos de hidrógeno a los radicales; entre más capacidad antioxidante posee el AH, más se conservará la emisión de luz de la fluoresceína. Por esta razón, este ensayo puede realizarse en un espectrofotómetro de fluorescencia [27]. En la **Ecuación 1**, se muestra la reacción de los radicales peroxilo con los antioxidantes (AH) [23].



1.6 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

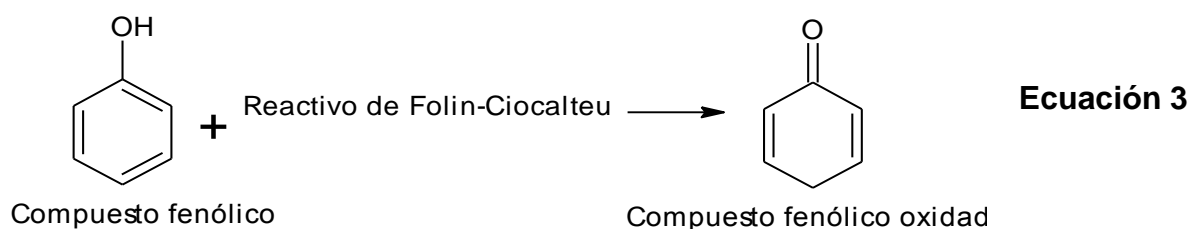
El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} ha sido usado por la industria alimenticia para determinar la actividad antioxidante en diferentes muestras, entre ellas, pulpa de frutas [55] y algunos colorantes alimenticios sintéticos [56]. Esta prueba consiste en el monitoreo espectrofotométrico de una reacción de óxido-reducción donde los antioxidantes se oxidan y el catión-radical ABTS^{•+} se reduce a su forma ABTS [57]. En esa reacción, aparece una decoloración, que genera una

disminución en la absorbancia; el grado de decoloración se expresa como porcentaje de inhibición del catión-radical, el cual se calcula en función de la concentración y el tiempo. El catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ se produce a partir de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio. Los resultados de este ensayo se expresan mediante unidades $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ [58]. En la **Ecuación 2**, se muestra la reacción entre el radical $ABTS^{+\bullet}$ y los antioxidantes (AH) [23].



1.7 Determinación del contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos están conformados por un anillo aromático y uno o varios grupos hidroxilo; poseen diversas estructuras y propiedades biológicas, entre ellas, una gran capacidad antioxidante contra el daño oxidativo causado por radicales libres [59]. El método más utilizado para la determinación y cuantificación de fenoles es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Este consiste en la medición de los fenoles que reaccionan con agentes oxidantes; en este procedimiento, se usa el reactivo Folin-Ciocalteu, que está conformado por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico, que reaccionan con cualquier fenol para dar productos cromóforos [60]. El método de Folin-Ciocalteu es un ensayo colorimétrico, basado en una reacción de óxido-reducción, donde el reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce y los compuestos fenólicos se oxidan en un medio básico. Esta reacción es notoria debido a un cambio de color, de amarillo a azul. Gracias a este cambio de color, es posible monitorear la reacción en un espectrofotómetro. La absorbancia del color azul se mide a una longitud de onda de 750 nm, y la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos [61]. En la **Ecuación 3**, se muestra la reacción entre el reactivo Folin-Ciocalteu y fenoles [23].



1.8 Caracterización de los compuestos y técnicas instrumentales

La mayoría de muestras biológicas que se encuentran en la naturaleza, son mezclas complejas, como el petróleo, aceites esenciales, extractos vegetales, entre otras; para la identificación de la composición química de una mezcla, se necesita su separación. La cromatografía es una técnica útil para separar compuestos, que tiene ciertos alcances o límites, según algunas propiedades fisicoquímicas de las sustancias, como son la polaridad, la termoestabilidad y el peso molecular. La cromatografía líquida es apta para sustancias de alto peso molecular (> 450 Da), termolábiles y polares; la cromatografía gaseosa analiza sustancias de mediana o alta volatilidad, bajo peso molecular y termoestables [62]. Por esta razón, es necesario el análisis por medio de las dos técnicas cromatográficas para identificar y cuantificar los compuestos de bajo y alto peso molecular de los extractos obtenidos.

1.8.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía gaseosa (GC) puede separar compuestos en una mezcla, que poseen propiedades como la alta termoestabilidad, el bajo a mediano peso molecular y la volatilidad de las moléculas. Debido a estas condiciones, la GC es una técnica apta solo para el 10% de las muestras, aproximadamente [62]. Este método se utilizó para separar los compuestos de bajo peso molecular presentes en cada uno de los extractos obtenidos de la flor de *B. macrophylla*. Estos, posteriormente, se identificaron por medio de sus espectros de masas e índices de retención.

Como mencionan Stashenko, E. E. y Martínez, J. R. (2010) [63], “*la necesidad de identificar inequívocamente los componentes de una mezcla, fue el motor para el desarrollo de diferentes métodos de acoplamiento tandem*”; uno de estos métodos tandem, es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La unión de estas dos técnicas fue idónea, ya que la GC acoplada a la MS con impacto de electrones (EI) puede identificar compuestos de bajo peso molecular y termoestables [62]. El método GC-MS consiste en la separación de cada compuesto presente en una muestra, según su tiempo de retención, en una columna cromatográfica (apolar o polar), y en la obtención de espectros de masas para todos los componentes del cromatograma. Estos espectros y tiempos de retención se comparan con los de bases de datos certificadas, confiables, y algunos artículos de otros autores [64, 65]. Se logra un gran avance en la caracterización de los compuestos de una mezcla, por medio de los índices de retención y los espectros de masas referenciales.

1.8.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida (LC) es una técnica apta para el análisis de moléculas polares, termolábiles y de alto peso molecular [66]. Algunos compuestos de los extractos vegetales no son termoestables, y pueden descomponerse en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. También, se presentan compuestos poco volatilizables y de alta polaridad como los flavonoides; para la identificación de este tipo de compuestos es necesario el uso de otra técnica que permita el análisis de compuestos polares, termolábiles y de alto peso molecular. Esta técnica de separación, es la cromatografía líquida [66].

La LC se ha usado en el análisis de compuestos de polaridades media y alta, entre ellos, algunos metabolitos secundarios de las especies vegetales. Para este análisis, se debe tener en cuenta la selección de la fase estacionaria, ya que varía según la naturaleza y propiedades de los analitos [66, 67]. Cuando la muestra se disuelve, los analitos son arrastrados a lo largo de la columna cromatográfica por medio de la fase móvil; allí, los analitos interactúan en diferentes grados con la fase móvil y la fase estacionaria, y esto hace que los componentes de la muestra se separen, en función de estas interacciones; los coeficientes de distribución y los tiempos de salida diferentes de la columna, son su manifestación.

Para el análisis de compuestos fenólicos y flavonoides, la LC-MS se ha usado como técnica de separación e identificación; en general, para el análisis de flavonoides, se utiliza HPLC en fase reversa (RP-HPLC) [68]. En LC se emplean sistemas de detección tales como detectores de arreglos de diodos (DAD), de fluorescencia y detectores de masas (MSD). Como los compuestos fenólicos están conformados por al menos un anillo aromático, estos compuestos absorben luz y es común que su análisis se realice también con HPLC/UV-vis [68].

1.8.3 Espectroscopia ultravioleta visible, método antocianinas monoméricas totales

Las antocianinas son compuestos fenólicos, que pertenecen al grupo de los flavonoides; están conformadas por una aglicona unida a un azúcar, por medio de un enlace glucosídico. Cumplen una función importante en la planta, desde otorgar protección contra la radiación ultravioleta, hasta atraer polinizadores [69].

Algunos de los compuestos encontrados en los pigmentos de frutos, hojas, y flores, son las antocianinas; a éstas se les atribuyen actividades anticancerígenas y antioxidantes. Debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción en el rango ultravioleta-visible, a pH muy bajos, lo que permite su

caracterización por medio de la espectroscopia ultravioleta-visible [70]. Un procedimiento, que se usa para determinar la calidad de alimentos, es el método de antocianinas monoméricas totales, llamado también método del pH diferencial. Este ensayo se basa en la transformación estructural del cromóforo de la antocianina en función del pH, que se puede monitorear por medio de espectroscopia UV-vis. El método de pH diferencial permite la medición cuantitativa de forma rápida y económica respecto a una antocianina específica [71].

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección y secado del material vegetal

Las flores de *B. macrophylla* se recolectaron en el jardín experimental del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander, sede Bucaramanga. El material vegetal fresco, se secó en un liofilizador (Véase **Figura 6**) de bandejas *Virtis Advance Plus* (SP Scientific, New York, EE.UU.) durante 24 h; seguidamente, el material vegetal se picó, tamizó, se sometió a una corriente de nitrógeno para garantizar una atmósfera inerte y se almacenó en oscuridad.



Figura 6. Liofilizador de bandejas *Virtis Advance Plus* (SP Scientific, New York, EE.UU.). Foto tomada por la autora. Lugar, CENIVAM-UIS, Bucaramanga.

2.2 Identificación botánica

Con el fin de tener seguridad en la identificación de la especie vegetal, se elaboró una *exsiccata* de *B. macrophylla*, que se envió al Herbario Nacional Colombiano, ubicado en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá).

2.3 Obtención de los extractos

2.3.1 Reactivos

AAPH (clorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano), 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Acetato de sodio (99%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Acetonitrilo grado LC-MS (99.9%, Honeywell Burdick & Jackson, New Jersey-EE.UU.).

Ácido acético (99.9%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Ácido clorhídrico (37%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Ácido fórmico (98%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Ácido gálico (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

BHT (Butilhidroxitolueno, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Cianidina (99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth-Alemania).

Cianidina-3-glucósido (99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth-Alemania).

Cianidina-3-rutinósido (99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth-Alemania).

Cloruro de potasio (99.5%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Etanol (99.9%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Fluoresceína (benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Galato de epigallocatequina (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Hidróxido de sodio (99%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Metanol (99.9%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Pelargonidina-3-glucósido (99%, PhytoLab, Vestenbergsgreuth-Alemania).

Persulfato de potasio (PDS, 97%, Merck, Darmstadt-Alemania).

Quercetina-3-ramnosa (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Quercetina-3-rutinósido (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Reactivo de Folin-Ciocalteu (2N, Merck, Darmstadt-Alemania).

n-Tetradecano, ISTD (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).)

α -Tocoferol (96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico, 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

2.3.2 Dispersión de la matriz en fase sólida

Para la obtención de extractos por MSPD, se empleó la metodología propuesta por Xiao, H.B. *et al.* (2004) [72], en la cual se mezcló material vegetal (0,5 g), Silice-C₁₈ (0,5 g) y metanol (1 mL) como agente dispersante. Como solvente de elución, se utilizó la mezcla metanol-agua (10 mL, 9:1). Al extracto obtenido, se le retiró el solvente, por medio de rota-evaporación (Rota-evaporador, *Heidolph, Hei-VAP Advantage HL*, Chicago, EE.UU.) y liofilización. Posteriormente el extracto, se almacenó en frascos ámbar, a una temperatura de 4°C, para su posterior análisis.

2.3.3 Extracción con fluido supercrítico

En la obtención de extractos con fluido supercrítico (SFE), se implementó la metodología realizada por Paes, J. *et al.* (2014) [73] con algunas modificaciones. La extracción se realizó bajo las siguientes condiciones: 200 bar de presión, 40 °C de temperatura, un flujo de CO₂ de 40 g/min y como co-solvente etanol. El material vegetal (375 g), se envasó en una cámara de 2 L de un equipo de extracción supercrítica a escala piloto *Thar SFE-2000-50 FMC* (*Thar Instruments*, Inc, Pittsburgh, PA, EE.UU.), provisto con un porta-muestra en acero inoxidable, un regulador automático e independiente de temperatura y presión, bombas de alta presión *P-200^a*, para el CO₂, y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo* tipo *MASS6000* (*Siemens AG*, Berlín, Alemania).

2.3.4 Extracción con solventes

En la extracción con solventes, se usó la metodología implementada por Ersus, S. *et al.* (2007) [74], con algunas modificaciones. El solvente fue la mezcla etanol-agua, en diferentes proporciones, y se utilizó sonicación.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción, se realizó un diseño experimental 2^3 del método de extracción, con cuadruplicado en el punto central, donde el observable fue el contenido de antocianinas monoméricas totales, determinado por el método pH diferencial. Las siguientes fueron las tres variables de extracción: 1). Relación etanol-agua como solvente; 2). Porcentaje de acidez (% HCl) y 3). Temperatura de extracción (°C). Los niveles de cada una de las variables de extracción se pueden apreciar en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Matriz de experimentos para el diseño experimental 2^3 de la extracción con solvente.

N°	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
Variable X1, relación etanol-agua (v/v)			
-1	0		1
2-1	5-1		8-1
Variable X2, %HCl (% v/v)			
-1	0		1
0	0,5		1
Variable X3, temperatura (°C)			
-1	0		1
30	40		50

Para la obtención de los extractos, se usó flor liofilizada (1 g), se adicionó la mezcla hidro-etanólica (20 mL) y se llevó a un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania), durante 15 min. El residuo se separó por filtración por gravedad y se extrajo una vez más, bajo las mismas condiciones. Los extractos obtenidos se roto-evaporaron (Rota-evaporador, *Heidolph, Hei-VAP Advantage HL*, Chicago, EE.UU.), se liofilizaron (Véase **Figura 6**, *Virtis Advance Plus*, New

York, EE.UU.) con el fin de eliminar el solvente de las extracciones, e inmediatamente se almacenaron a 4°C y protegidos de la luz para su posterior análisis.

Para el tratamiento estadístico de los datos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados. La variable de respuesta fue el contenido de antocianinas monoméricas totales. A partir del análisis de varianza, se determinó cuáles variables y sus interacciones tuvieron un efecto significativo en la obtención de antocianinas.

2.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno

La metodología propuesta por Ou, B. *et al.* (2001) [27], con algunas modificaciones, se utilizó en este estudio. Se empleó un lector de microplacas (*Turner Biosystems Inc. Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, CA, EE.UU.) de 96 pozos (Véase **Figura 7**), a 37 °C, en el modo fluorescencia y a una longitud de onda de 510 nm; como molécula fluorescente, se usó fluoresceína y como patrón de referencia, Trolox®. La capacidad antioxidante se midió a partir de la diferencia de disminución de fluorescencia, entre el área bajo la curva (ABC) de los extractos y el ABC del blanco (Véanse **Ecuaciones 4 y 5**). Esta diferencia, llamada área neta, se expresó en $\mu\text{molTrolox}^{\circledR}/\text{g}$ de extracto, por medio de una curva de calibración. Con el fin de comparar la actividad de los extractos con otros antioxidantes de uso industrial, se midió la actividad para el BHT y el α -tocoferol bajo las mismas condiciones. Cada medición se realizó tres veces.

$$ABC = \sum_{f_t=0}^{88} f_t \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde, f_t es el valor de fluorescencia en un tiempo t (min).

$$ABC_{neta} = ABC_{muestra} - ABC_{blanco} \quad \text{Ecuación 5}$$



Figura 7. Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II*, CA, EE.UU. Foto tomada por la autora. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga.

2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

La evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS^{•+}, se realizó bajo la metodología reportada por Re, R. *et al.* (1999) [58] con algunas modificaciones. Se usó un lector (Véase **Figura 7**) de microplacas (*Turner Biosystems Inc. ModulusTM II Microplate Multimode Reader*, CA, EE.UU.) de 96 pozos, en el modo absorbancia, a una longitud de onda de 734 nm. El catión-radical ABTS^{•+} se formó a partir de una solución de ABTS (7 mM) en *buffer* acetato de sodio (20 mM, pH 4.5) y una solución de persulfato de potasio (2.45 mM). La solución resultante se llevó a un baño de ultrasonido por 30 min, y se mantuvo a 4 °C, protegida de la luz durante 24 h, tiempo requerido para la estabilidad del catión-radical ABTS^{•+}. Cumplido el tiempo necesario, se tomó solución de catión-radical ABTS^{•+} (aprox. 1000 µL) y se diluyó en la solución *buffer* hasta alcanzar una absorbancia de 0.71; logrado este valor, la solución final se almacenó en la nevera a 4 °C, durante 30 min, hasta su uso. Los extractos fueron diluidos en *buffer*, a cada placa del lector se adicionaron la muestra y la solución final del catión-radical ABTS^{•+}. Para expresar los resultados en unidades de µmolTrolox[®]/g de extracto, se realizó una curva de calibración con Trolox[®] y se determinó el porcentaje de inhibición por medio de la **Ecuación 6**. Cada medición se realizó por triplicado.

$$\%Inhibición = \frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} * 100\% \quad \text{Ecuación 6}$$

2.6 Determinación del contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu

Para determinar el contenido total de fenoles se empleó la metodología descrita por Magalhaes, L.M. *et al.* (2010) [75], usando ácido gálico como patrón de referencia, para realizar una curva de calibración y expresar el contenido fenólico en mg ácido gálico/g de extracto. En este ensayo se empleó un lector (Véase **Figura 7**) de placas (*Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*, CA, EE.UU.), con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia. Se preparó la solución del reactivo de Folin-Ciocalteu (2.0 N) en agua tipo I, y una solución de hidróxido de sodio (0.35 M) para obtener el medio básico. Las mediciones se realizaron en el modo de absorbancia, y a una longitud de onda de 750 nm, con una temperatura de 25 °C. Cada medición se realizó por triplicado.

2.7 Caracterización de los compuestos y técnicas instrumentales

2.7.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis de los compuestos de bajo peso molecular, se realizó en un cromatógrafo de gases GC 7890 (*Agilent Technologies, AT, Palo Alto, CA, EE.UU.*), acoplado a un detector selectivo de masas MSD 5975C (*AT, Palo Alto, CA, EE.UU.*) con ionización por impacto de electrones (EI) de 70 eV. Se usó una columna cromatográfica apolar [DB5-MS de 60 m x 0.25 mm 0.25 µm, con fase estacionaria de 5% poli(dimetilsiloxano)]. Los datos se procesaron en el *software GC ChemStation Versión B.01.03*. La identificación de los compuestos se realizó comparando los índices de retención lineales y los espectros de masas obtenidos experimentalmente, con los reportados en las bases de datos ADAMS y NIST [64, 76]. Los índices de retención lineales se hallaron por medio de los tiempos de retención de los analitos y los tiempos de retención de una mezcla de hidrocarburos, según la **Ecuación 7** [77].

$$IRL = 100n + 100 \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

IRL: Índice de retención lineal del analito.

n: Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del analito.

t_{Rx} : Tiempo de retención del analito.

t_{RN} : Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del analito.

t_{RN} : Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye después del analito.

2.7.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

El análisis de los compuestos fenólicos, se realizó en un cromatógrafo líquido HPLC (*AT 1200 Series*, Palo Alto, CA, EE.UU.) con ionización por electronebulización (ESI), acoplado a un detector de masas MSD con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS 6210, AT, Palo Alto, CA, EE.UU.), operado en modo positivo, con 4000 V en el capilar y 200 V en el fragmentador (Véase **Figura 8**). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C_{18} *Kinetex* (*Phenomenex*, Torrance, CA, EE.UU.) de 100 m x 4,6 mm d.i., 2.6 μ m de tamaño de partícula. La fase móvil A, fue una solución acuosa con ácido fórmico al 0.2% y la fase móvil B, acetonitrilo con ácido fórmico al 0.2%. La condición inicial de gradiente fue de 90% de A y 10% de B, cambiando linealmente hasta 20% de B en 5 min, después 80% de B en 10 min, se mantuvo durante 5 min, posteriormente, cambió a 100% de B en 5 min, y se mantuvo durante 5 min, el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min. El flujo fue de 0,2 mL/min y el volumen de inyección fue de 4 μ L. Los valores obtenidos se procesaron por medio del *software MassHunter*, versión B.02.00-SP3. La identificación de los compuestos se realizó con base en los tiempos de retención y los espectros de masas, con patrones certificados, y estudiando el patrón de fragmentación del ion molecular.



Figura 8. Cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas (TOF), por medio de una interface ESI. Foto tomada por Dra. Elena Stashenko. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga.

2.7.3 Espectroscopia ultravioleta visible: método antocianinas monoméricas totales

El análisis de las antocianinas se realizó en un espectrofotómetro *JENWAY* 6300 (Burlington, EE.UU.), en el rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm. Se implementó el método diferencial de pH, descrito por Giust, M. *et al.* (2001) [71]. Se usaron dos soluciones, la primera, del ácido clorhídrico-cloruro de potasio (0.025 M) a pH 1.0, y la segunda, del ácido acético-acetato de sodio (0.4 M) a pH 4.5. Se tomó una cantidad determinada de los extractos (los miligramos necesarios para que la lectura de absorbancia estuviera en el rango de 0.100 a 1.00, a $\lambda = 516$ nm y $\lambda = 700$ nm) y se le adicionó solución de cada una, por separado. Se midió la absorbancia frente a un blanco (las soluciones *buffer*) en las longitudes de onda 516 y 700 nm. La absorbancia total se calculó, según la **Ecuación 8**.

$$A_T = (A_{516nm} - A_{700nm})_{pH\ 1.0} - (A_{516\ nm} - A_{700\ nm})_{pH\ 4,5} \quad \text{Ecuación 8}$$

La absorbancia total se usó para hallar el contenido de antocianinas monoméricas totales, por medio de la **Ecuación 9**.

$$\text{Antocianinas monoméricas, } \frac{mg}{L} = \frac{A_T * PM * FD * 1000}{\epsilon * l} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde, A_T es la absorbancia total, PM es el peso molecular de la antocianina a evaluar, pelargonidina-3-glucósido (433.1135 g/mol), FD es el factor de dilución, ϵ es la absortividad molar de la antocianina ($31620\ L * mol^{-1} * cm^{-1}$) y l es la longitud atravesada por la luz (1 cm).

Los valores de PM y ϵ corresponden a los de pelargonidina-3-glucósido. Los resultados se expresaron en mg de pelargonidina-3-glucósido/L.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Identificación botánica

En el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), se realizó la identificación de la especie vegetal, que se encuentra en el jardín experimental del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (7°08'25.1"N 73°06'58.4"W, Bucaramanga). La caracterización de la especie en estudio se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Identificación taxonómica de *Brownea macrophylla*.

Genero	Especie	Familia	N° Voucher COL
<i>Brownea</i>	<i>macrophylla</i>	Fabaceae	582310

3.2 Análisis del estudio por espectroscopia UV-vis por el método del contenido total de antocianinas monoméricas de los extractos con solvente

Se elaboró un diseño experimental 2^3 , que corresponde a 3 variables en estudio con dos niveles por variable, con cuadruplicado en el punto central (Véase **Tabla 3**), con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción de antocianinas. El observable fue el valor del contenido total de antocianinas monoméricas, por medio del método de Ph diferencial, descrito en las **Secciones 3.3.4.y 3.7.3**. Los resultados del diseño experimental, con su observable (mg pg-3-glu/L), se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Valores del contenido total de antocianinas monoméricas (mg pg-3-glu/L) de los extractos hidro-etanólicos de flores de *B. macrophylla*.

N°	X1: Etanol:Agua	X2: HCl, %	X3: Temperatura, °C	Cantidad, mg pg-3-glu/L
1	2:1	0	30	38,49
2	8:1	0	30	47,39
3	2:1	1	30	30,41
4	8:1	1	30	48,08
5	2:1	0	50	28,35
6	8:1	0	50	12,60
7	2:1	1	50	18,22
8	8:1	1	50	43,15
0	5:1	0.5	40	17,62
0	5:1	0.5	40	17,26
0	5:1	0.5	40	16,57
0	5:1	0.5	40	17,81

En la **Tabla 5**, se muestra que el experimento 4 arrojó el valor más alto del contenido total de antocianinas monoméricas. Sin embargo, se realizó un ANOVA, para establecer cuáles variables e interacciones entre las variables fueron significativas en la obtención de antocianinas.

Tabla 6. Efectos de las variables de estudio y sus posibles combinaciones.

Valores Fischer	EFECTOS						
	Mezcla	% HCl	Temp.	Mezcla/ % HCl	Mezcla/ Temp.	Temp./ % HCl	Mezcla/%HCl/ Temp.
Fischer cal	541,14	71,69	1630,14	1035,24	128,12	327,36	431,26
F _{umbral} Fischer*	10,13						

* El valor F_{umbral} Fischer, se halló, usando el *software* Microsoft Excel.

En el ANOVA, se realizó un análisis de efectos principales por medio de la prueba F con el 95% de confianza, y se encontró, que las variables X1, X2, X3 y las interacciones entre ellas, presentaron efectos significativos, según el análisis estadístico (Véase **Tabla 6**). Esto quiere decir, que todas las variables inciden significativamente en la extracción para obtener mejores valores del contenido total de antocianinas monoméricas. El efecto de la temperatura fue el más alto (1630.14), lo que indica que la temperatura es una variable importante para el

aislamiento de antocianinas. En el diseño, el mayor valor del contenido total de antocianinas monoméricas se obtuvo con la temperatura más baja (30 °C). Esto concuerda con lo encontrado por Vatai, T. *et al.* (2009) [78], quienes evaluaron el contenido de antocianinas en uvas rojas para las cepas Refosco, Merlot y Cabernet de una marca comercial de vinos. Ellos encontraron que, al disminuir la temperatura, el valor de antocianinas monoméricas totales aumentó. También estudiaron el contenido antociánico variando el solvente de extracción, desde agua, acetona y diferentes relaciones de etanol:agua, y encontraron que el contenido de antocianinas monoméricas totales fue mayor con la relación más alta de etanol:agua, lo que coincide con el diseño experimental que se usó en el presente trabajo, donde la relación 8:1 de etanol:agua fue la que produjo el mayor valor de mg pg-3-glu/L.

La variable de porcentaje de acidez (% HCl), aunque no tuvo un efecto tan grande, sí es significativa en la extracción. Este resultado tiene coherencia, debido a que las antocianinas tienen estabilidad en medios ácidos y preservan su coloración. Giusti, M. *et al.* (2001) [71], mostraron que a Ph 1.0, se mantiene estable el ion flavilio, responsable de la coloración rojiza, y a un Ph de 4.5, la estructura de la antocianina se pierde, abriéndose el anillo C y originando una estructura de chalcona, una forma incolora. El Ph tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas; la acidez tiene un efecto de estabilización sobre la molécula.

Como se muestra en la **Tabla 6**, las interacciones entre las variables bajo estudio también presentaron un efecto significativo en la obtención de antocianinas monoméricas totales, lo que indica, que es importante tener en cuenta las interacciones entre las variables al momento de realizar la extracción.

En las **Figuras 9 y 10** se muestra la influencia de los niveles de las variables sobre el observable, *i.e.*, antocianinas monoméricas totales, dejando constante la variable temperatura. Con base en las gráficas de superficie, se nota una tendencia de aumento en el observable a niveles altos de relación etanol-agua y porcentaje de acidez, para ambas temperaturas.

Temperatura (-1): 30 °C

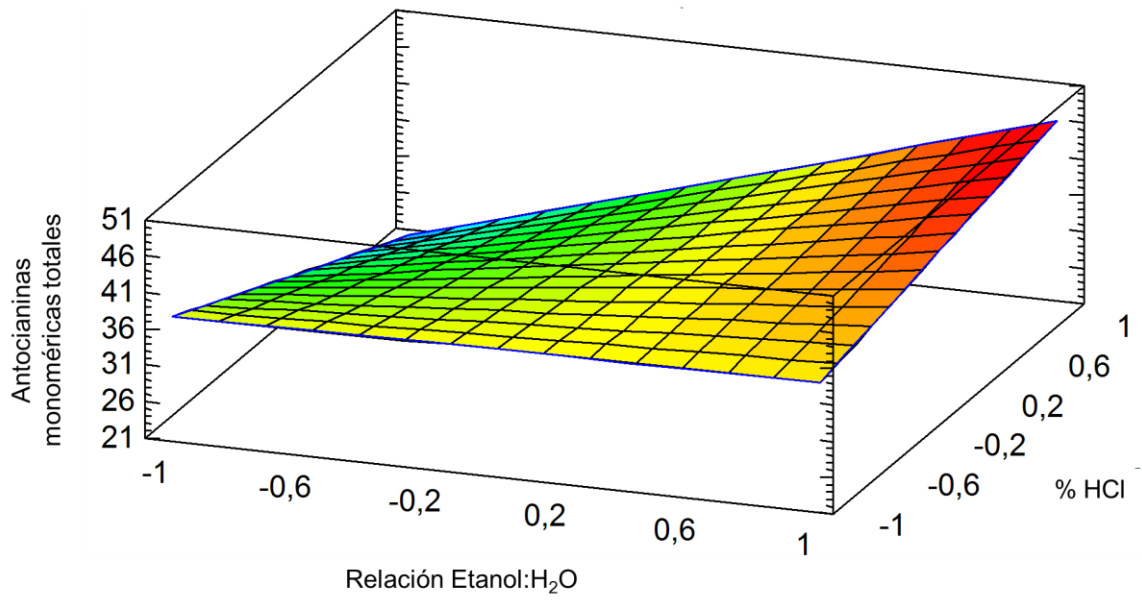


Figura 9. Gráfica de superficie a temperatura constante en el nivel inferior (30 °C).

Temperatura (+1): 50 °C

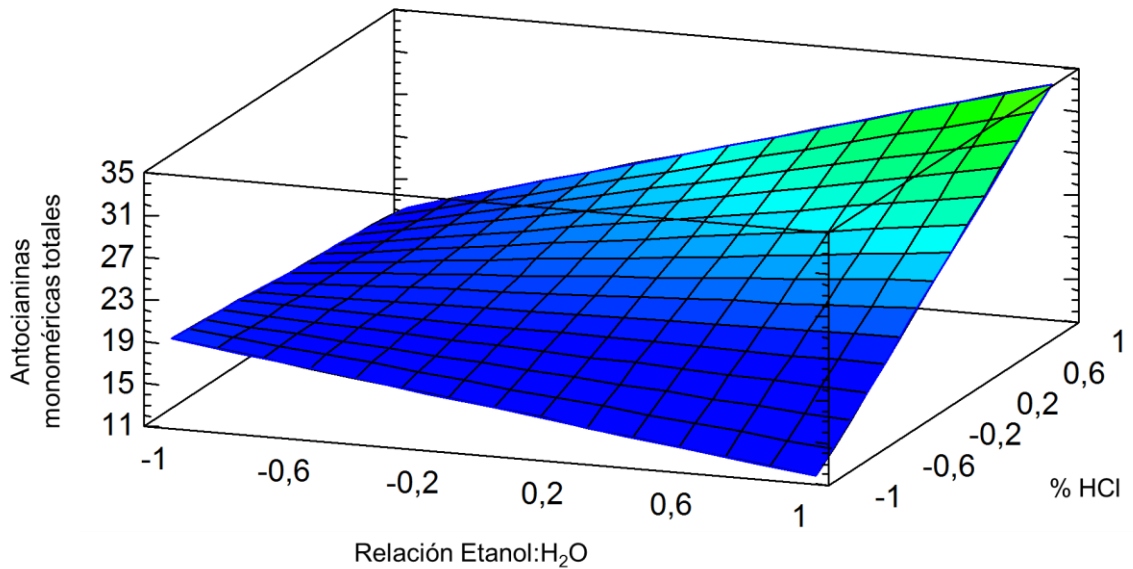


Figura 10. Gráfica de superficie a temperatura constante en el nivel superior (50 °C).

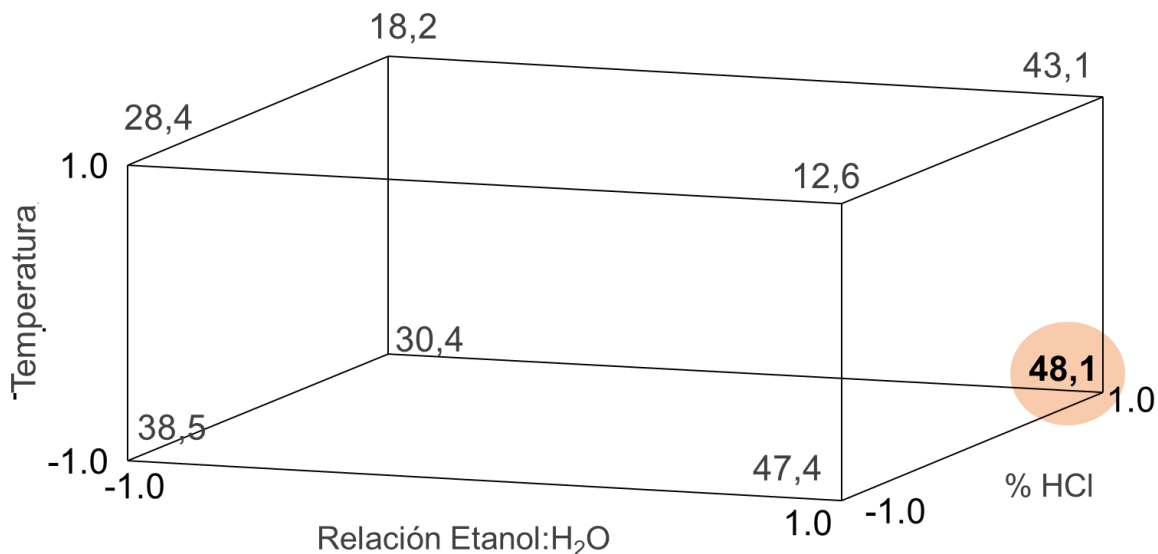


Figura 11. Representación gráfica del diseño 2^3 , con los valores del contenido de antocianinas monoméricas totales.

En la **Figura 11**, se muestra el campo de muestreo con los valores de los observables obtenidos, cuando se monitorearon tres variables de extracción. En la gráfica, se puede apreciar que las condiciones de extracción para obtener el mayor contenido de antocianinas monoméricas totales son: temperatura baja (30 °C), contenido de ácido clorhídrico alto (1% HCl) y la relación de etanol:agua (8:1) más alta.

El extracto hidro-etanólico 4, que presentó el mayor contenido de antocianinas en mg pg-3-glu/L (48,1 mg pg-3-glu/L), fue seleccionado para determinar la actividad antioxidante, el contenido fenólico y para realizar su análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y espectroscopia ultravioleta-visible.

3.3 Identificación por GC-MS de los compuestos extraídos por SFE

El análisis del extracto obtenido con fluido supercrítico, se realizó con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, bajo la metodología descrita en la **Sección 3.7.1**. En la **Tabla 7** y en la **Figura 12**, se muestran los metabolitos presentes en el extracto. Su identificación se realizó con base en dos parámetros: el primero, la determinación de los índices de retención lineales (Véase **Sección 3.7.1**) de cada analito, y su comparación con índices de bases de datos y artículos de otros autores [64, 65, 79]; el segundo parámetro de identificación, fue la comparación de los espectros de masas experimentales (Véase **Anexo 1**) con espectros de bases de datos de referencia [64, 76].

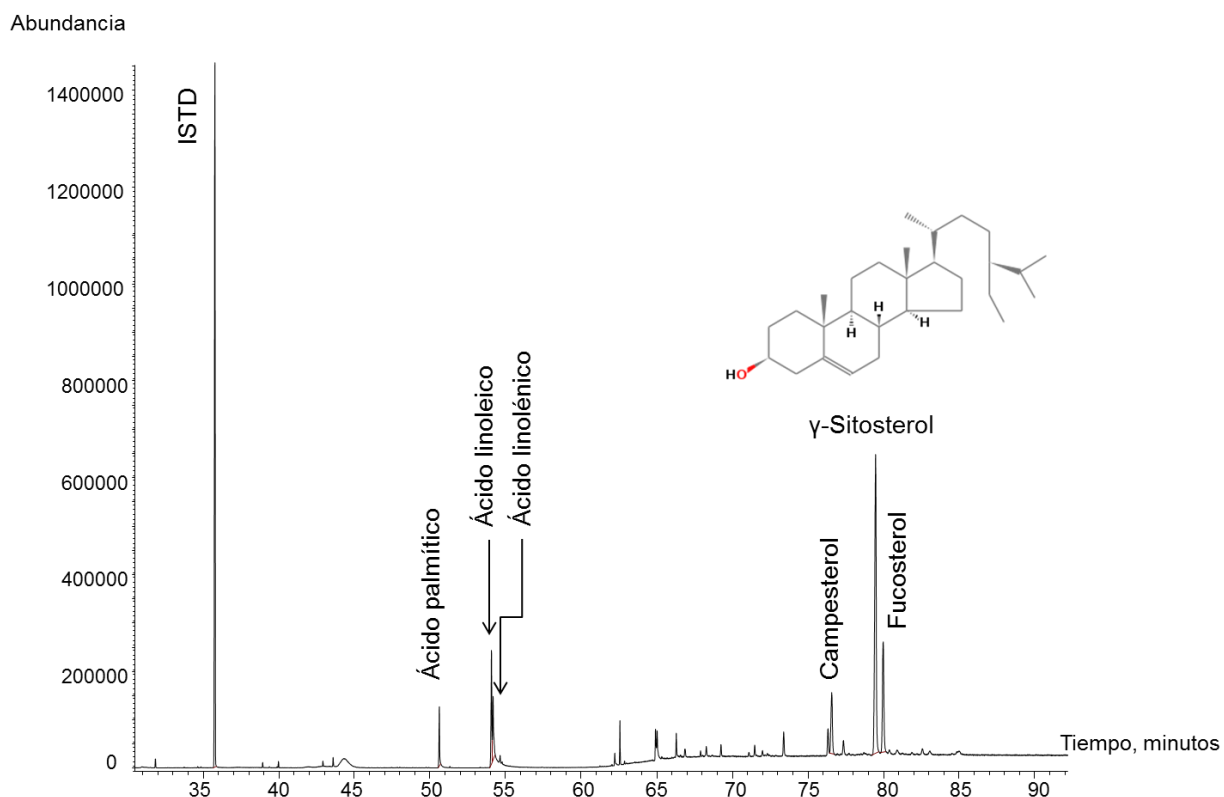


Figura 12. Cromatograma del extracto con SFE de flores de *B. macrophylla* obtenido por GC-EI-MS

Tabla 7. Identificación por GC-MS de compuestos en el extracto, obtenido con SFE, de flores de *B. macrophylla*.

Nombre	Fórmula	IRL, DB-5		A/A _{ISTD}	Clasificación
		Experimental	Literal		
Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1955	1955 ^[79]	0,072	AGS
Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2128	2130 ^[79]	0,17	AGI, C18:2
α-Ácido linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	2133	2134 ^[64]	0,13	AGI, C18:3
Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	3281	3305 ^[65]	0,18	Fitoesterol
γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	3325	3351 ^[64]	0,9	Fitoesterol
Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	3331	3305 ^[64]	0,17	Fitoesterol

AGS: Ácido graso saturado.

AGI: Ácido graso insaturado.

La soya (*Glycine max*) que pertenece a la familia Fabaceae, la misma de la *Brownea*, en su composición química, presenta en común con las flores de *B. macrophylla* los ácidos grasos linoleico, linolénico y palmítico (Véase **Tabla 7**) [80]. El ácido palmítico es un ácido graso precursor de otros ácidos grasos más largos y de la vitamina A, participa en la regulación de hormonas, y tiene funciones de transmisión de mensajes entre células [81].

En el extracto obtenido con fluido supercrítico de flores de *B. macrophylla*, se identificaron los siguientes fitoesteroles: fucosterol, campesterol y γ -sitosterol (Véase **Tabla 7**), los cuales poseen funciones de soporte y estructura para la célula vegetal; estos compuestos también están presentes en la soya, que posee γ -sitosterol y campesterol [82]. Lo anterior indica, que algunas especies de la misma familia, como la soya y la *B. macrophylla*, poseen composiciones químicas similares.

3.4 Análisis por LC-MS y UV-vis del extracto obtenido por solvente

El extracto obtenido con solvente, se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), con una interfaz de electronebulización, según, la metodología descrita en la **Sección 3.7.2**. La identificación de los compuestos del extracto, se realizó por LC-MS con solventes polares (agua, acetonitrilo), debido a que la mayoría de los compuestos que se extraen son de alta polaridad y termolábiles, lo cual impide su análisis por cromatografía de gases. En la **Tabla 8**, se muestran los compuestos del extracto identificados por LC-ESI⁺-TOF-MS; en la **Figura 13**, se aprecia el cromatograma del extracto hidro-etanólico obtenido de flores de *B. macrophylla*.

Tabla 8. Compuestos identificados por LC-ESI⁺-TOF-MS, en el extracto hidro-etanólico aislado de flores de *B. macrophylla*.

Compuesto	Fórmula	Masas		Δ ppm
		Experimental	Exacta	
Pelargonidina-3,5-diglucósido*	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1659	595,1663	0,67
Cianidina-3-glucósido**	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1089	449,1084	1,11
Pelargonidina-3-glucósido**	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,1143	433,1135	1,85
Pelargonidina*	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,0611	271,0606	1,80
Peonidina*	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301,0719	301,0712	2,32
Cianidina**	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0559	287,0556	1,05

*Identificación tentativa, según la fragmentación del ion molecular protonado.

**Identificación confirmatoria, basada en el uso de patrones y fragmentación del ion molecular protonado.

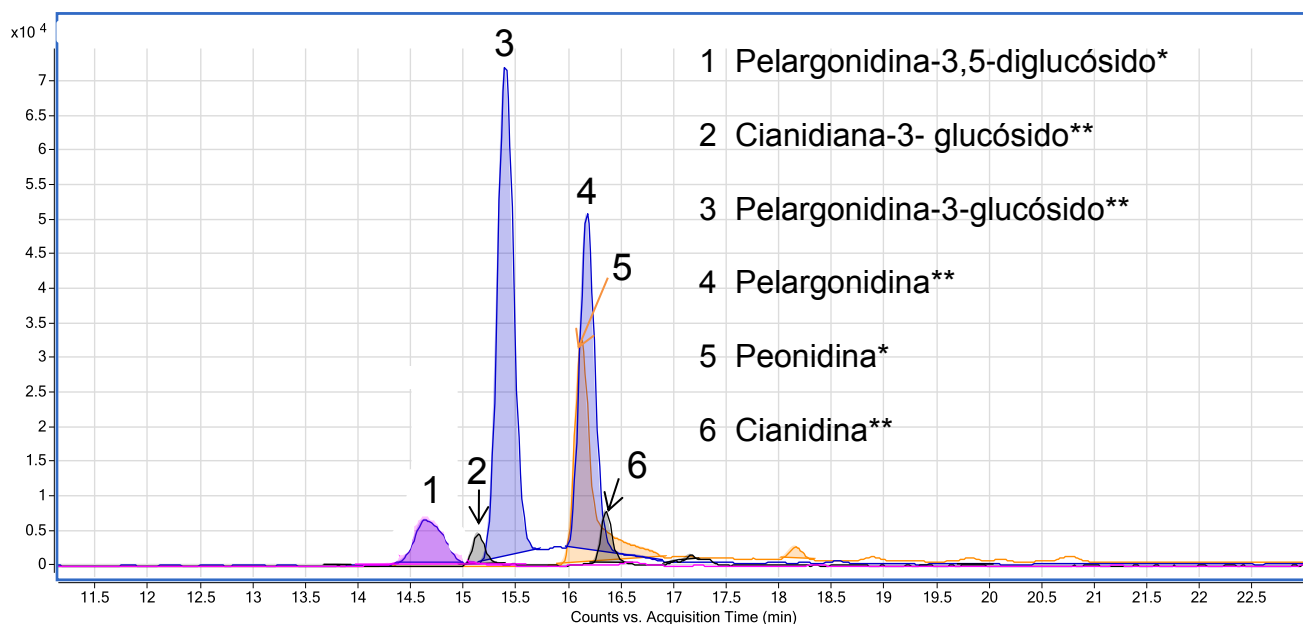


Figura 13. Cromatograma del extracto hidro-etanólico, obtenido de flores de *B. macrophylla*, por LC-ESI⁺-TOF-MS.

En el extracto hidro-etanólico se lograron identificar 6 compuestos de naturaleza polifenólica, de la familia de los flavonoides, concretamente, antocianinas. La identificación de los compuestos se realizó con base en la fragmentación de sus iones moleculares protonados, la comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención obtenidos, con los de patrones certificados. Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas (agliconas), contienen antocianidinas (Véanse **Figura 5** y **Tabla 2**) unidas a un glúcido (glicona) por medio de un enlace glucosídico. Analizando la fragmentación de la molécula, se logra identificar la antocianina. En la **Figura 14**, se muestra el espectro de masas de la pelargonidina-3,5-diglucósido: se observan tres picos que corresponden a los siguientes fragmentos: el primero de derecha a izquierda (alrededor de m/z 600), es el pico correspondiente a la molécula completa y cargada; el segundo pico (alrededor de m/z 430) corresponde a la pérdida del glúcido, generando la pelargonidina-3-glucósido, y el tercer pico (cercano a m/z 275), pertenece a la antocianidina, pelargonidina. Otro factor que se tuvo en cuenta para la identificación de los compuestos fue el Δ ppm, que constituye un error en la medición de las masas, que se halla por medio de la **Ecuación 10**. Los valores Δ ppm aceptados para la identificación de un compuesto, deben ser menores de 3,0 ppm.

$$\Delta ppm = \frac{\text{masa exacta} - \text{masa experimental}}{\text{masa exacta}} * 10^6$$

Ecuación 10

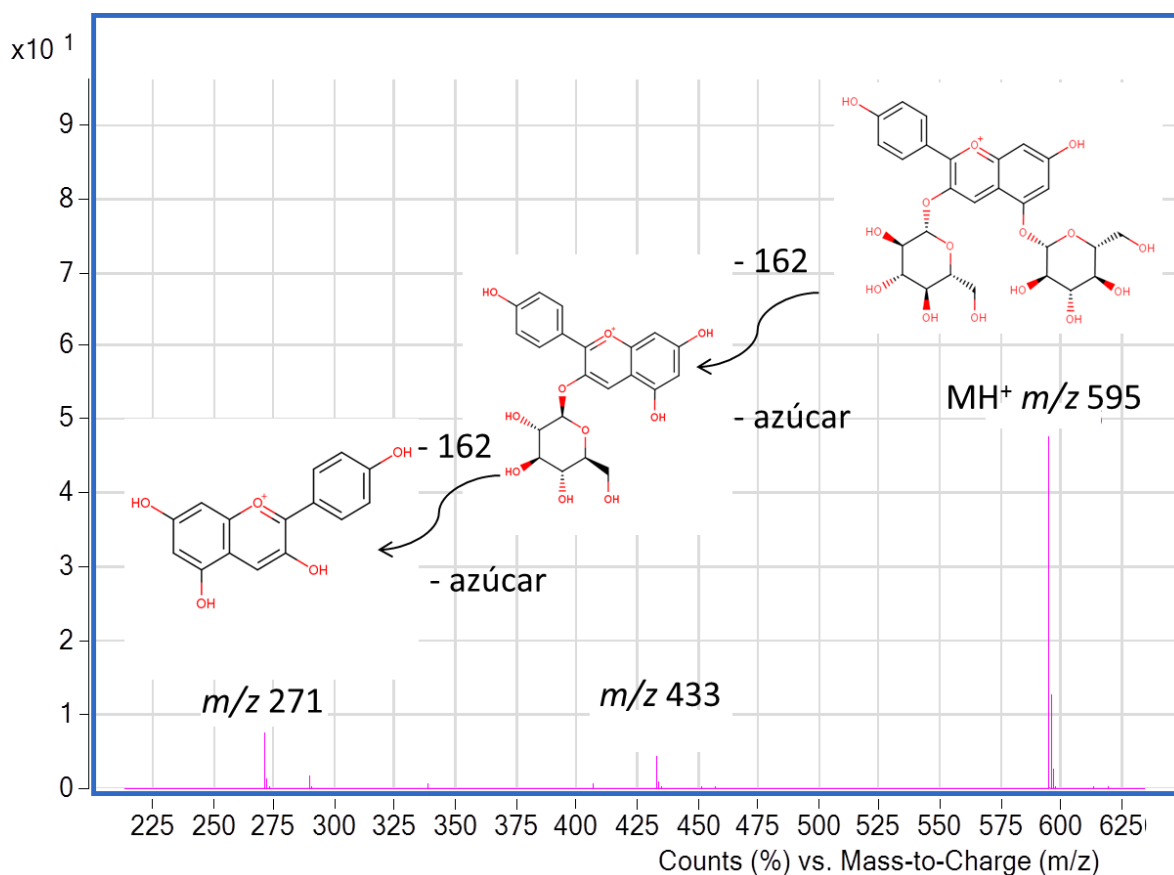


Figura 14. Espectro de masas de la pelargonidina-3,5-diglucósido, obtenido por LC-ESI⁺-TOF-MS.

Con el fin de realizar una identificación inequívoca, los t_R y espectros de masas de los compuestos se compararon con los de patrones certificados (Véase **Sección 3.3.1**). Tanto los tiempos de retención como los espectros de masas, coincidieron con los compuestos encontrados en el extracto. Infortunadamente, no todos los compuestos encontrados pudieron confirmarse, por la ausencia de algunos patrones. En la **Tabla 8**, se muestra que los flavonoides pelargonidina-3,5-

diglucósido y peonidina, no se confirmaron por medio de los patrones. Los espectros de masas de estos dos compuestos se reportan en el **Anexo 2**.

El extracto obtenido, con solvente se analizó por medio de espectroscopia ultravioleta-visible (Véase **Figura 15**) en medio ácido (pH 1.0 aproximadamente), con el fin de comparar el espectro del extracto de las flores de *B. macrophylla* con el reportado por Giusti, M. *et al.* (2001) [71].

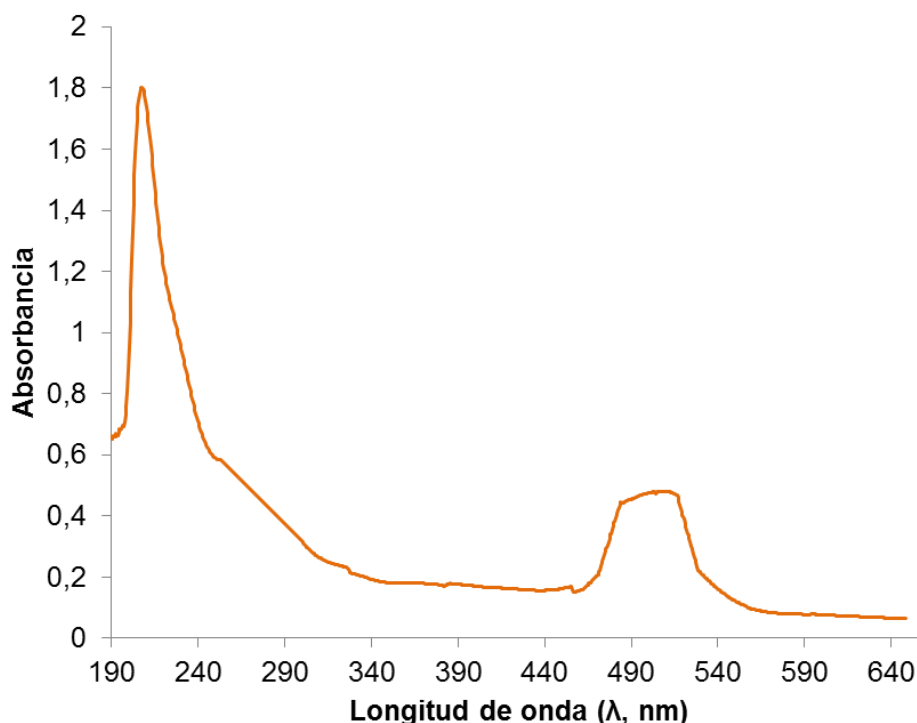


Figura 15. Espectro UV-vis (190-650 nm) del extracto hidro-etanólico de flores de *B. macrophylla*.

Los análisis realizados por LC-ESI⁺-TOF-MS del extracto aislado con solvente (Véase **Figura 13**), concuerdan con la información obtenida en el análisis de espectros UV-vis, y muestran que en dicho extracto están presentes estructuras antocianínicas. Las antocianinas poseen dos bandas características en el rango de UV-vis, la primera alrededor de los 200 nm, generada por el anillo aromático A, y la segunda, alrededor de los 490-550 nm, causada por la estabilidad del catión flavilio (Véase **Figura 16**) [83]. Las antocianinas son compuestos coloridos (rojizos), a causa de la carga positiva del catión flavilio, el cual permanece estable en medios muy ácidos (pH 1.0 aproximadamente) y absorbe energía en el rango de los 490-550 nm de longitud de onda, lo que indica que refleja en el rango de los

620-700 nm de longitud de onda aproximadamente, este rango corresponde al color rojo, el cual concuerda con el color de la flor de *B. macrophylla* (Véase **Figura 3**). En la **Figura 15** se muestra el espectro UV-vis del extracto hidroetanólico de flores de *B. macrophylla*, que se compara con el espectro UV-vis reportado por Giusti, M. *et al.* (2001) (Véase **Figura 17**) [71]: ambos espectros son bastantes parecidos.

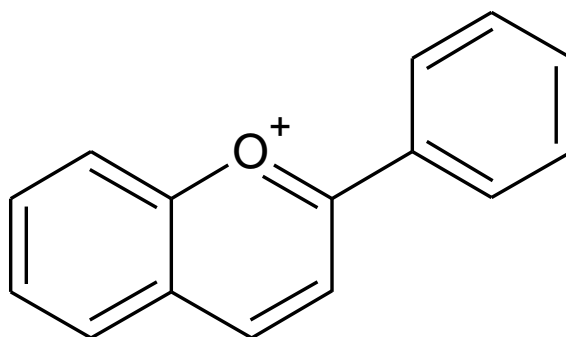


Figura 16. Cation flavilio.

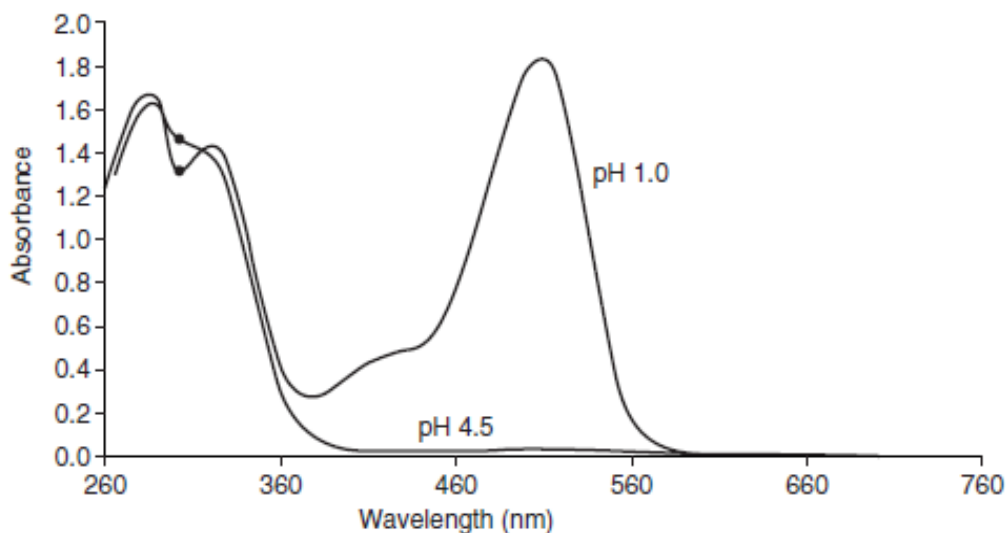


Figura 17. Espectro UV-vis de pelargonidina-3-soforósido-5-glucósido en pH 1.0 y pH 4.5. Tomado de Giusti, M. *et al.* (2001) [71].

3.5 Análisis por LC-MS y UV-vis del extracto obtenido por MSPD

El extracto obtenido por MSPD, se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con una interfaz de electronebulización, según la metodología descrita en la **Sección 3.7.2**.

En la **Tabla 9**, se muestran los compuestos identificados en el extracto, y en la **Figura 18**, se aprecia el cromatograma del extracto aislado por dispersión de la matriz en fase sólida de flores de *B. macrophylla*.

Tabla 9. Compuestos identificados por LC-ESI⁺-TOF-MS, en el extracto aislado por MSPD de flores de *B. macrophylla*.

Compuesto	Fórmula	Masas		Δ ppm
		Experimental	Exacta	
Pelargonidina-3,5-diglucósido*	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1669	595,1663	1,06
Pelargonidina-3-glucósido**	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,1143	433,1135	1,85
Galato de equigalocatequina**	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₁	459,0930	459,0922	1,74
Rutina (Quercetina-3-rutinósido)**	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611,1615	611,1607	1,31
Cianidina-3-rutinósido*	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1659	595,1663	0,67
Quercetina-3-galactósido*	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,1035	465,1028	1,50
Cianidina-3-glucósido**	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1089	449,1079	1,11
Quercitrina (Quercetina-3-ramnosa)**	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1072	449,1084	2,67
Cianidina**	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0559	287,0556	1,05

*Identificación tentativa, según la fragmentación del ion molecular protonado.

**Identificación confirmatoria, con base en patrones y fragmentación del ion molecular protonado.

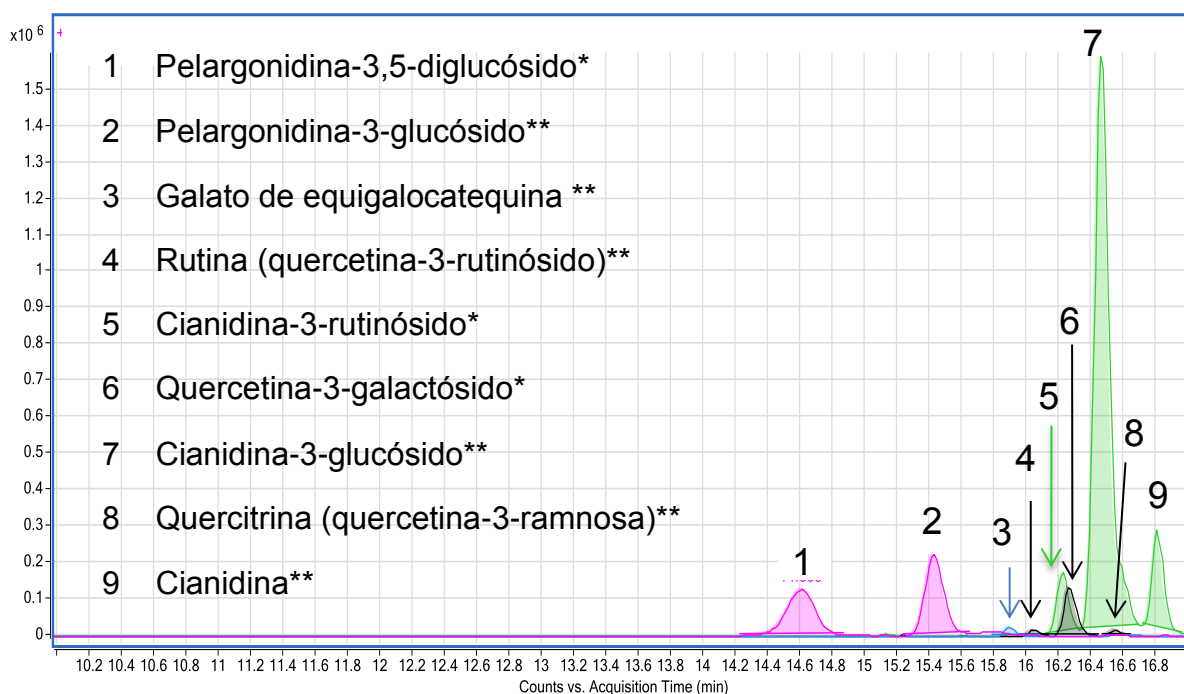


Figura 18. Cromatograma del extracto aislado, por MSPD, de flores de *B. macrophylla*, por LC-ESI⁺-TOF-MS.

Entre los compuestos identificados, no sólo se encontraron antocianinas (pelargonidinas y cianidinas), sino también flavonoles (quercetinas) y flavanoles (galato), esto indica que la técnica de MSPD, permitió extraer diferentes clases de flavonoides además de las antocianinas. Este aumento del número de compuestos aislados, puede deberse al solvente usado en la extracción. En la extracción por MSPD, el solvente de elución fue una mezcla metanol:agua (9:1), y en la extracción con solvente, se usó etanol:agua (8:1), lo que indica que el metanol actúa como mejor extractante, esto concuerda también con lo publicado por Galanakis, C.M. *et al.* (2013) [84], quienes obtuvieron mejores resultados de extracción con una mezcla metanólica que con una etanólica. Ellos propusieron, como justificación, que el metanol es un compuesto alifático de menor tamaño en comparación con el etanol, y esto, facilita la interacción con los compuestos fenólicos, y genera su mejor solubilidad de estos compuestos en dicho solvente (como ejemplo, quercitrina: 40 mg/mL en metanol, 30 mg/mL en etanol, a 20 °C [85]).

La identificación de los compuestos encontrados en el extracto, se realizó con base en la fragmentación del ion molecular protonado, el Δ ppm, y los tiempos de retención de los patrones, según se describió en la **Sección 4.5**. Los espectros de

masas de los compuestos, identificados tentativamente, se encuentran en el **Anexo 3**.

El extracto aislado por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) de las flores de *B. macrophylla*, se analizó por espectroscopia ultravioleta-visible en medio ácido (pH 1.0 aproximadamente) (Véase **Figura 19**).

Los espectros UV-vis de los flavonoides en metanol, presentan dos bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Para los flavonoles se presentan, una, en el rango de 230-280 nm, y la otra, en el rango de los 300-390 nm, aproximadamente [86]. Gracias a la identificación hecha por LC-ESI⁺-TOF-MS del extracto obtenido por MSPD (Véase **Figura 19**), se muestra que el extracto presenta posiblemente antocianinas y flavonoles, por lo cual, se esperaría que el espectro UV-vis de este extracto presente las dos bandas características de los flavonoles (230-280 y 300-390 nm).

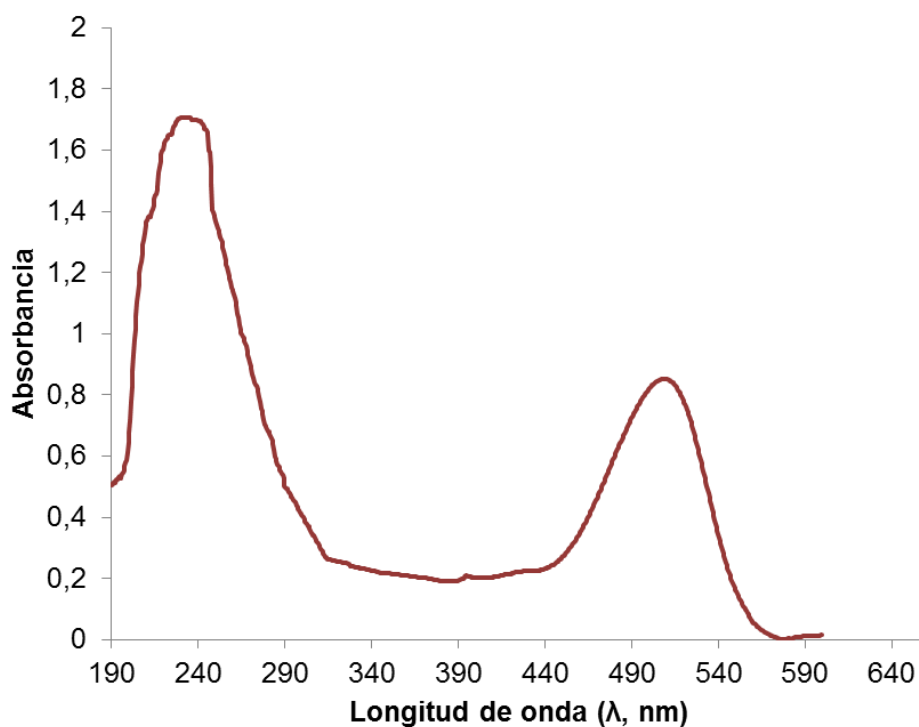


Figura 19. Espectro UV-vis (190-650 nm) del extracto de flores de *B. macrophylla*, obtenido por MSPD.

Sin embargo, la **Figura 19**, muestra que la segunda banda se encuentra en el rango de 450-540 nm, es decir, se presentó un efecto batocrómico (desplazamiento a longitudes de onda mayor), el cual puede deberse a la presencia de grupos cromóforos y conjugaciones en las moléculas bajo estudio (Véase **Figura 5**) y las antocianinas presentes en el extracto. Nuevamente, la absorción de energía presentada en el rango de 450-540 nm, muestra que el reflejo de este extracto se encuentra en el rango de 620-700 nm de longitud de onda, aproximadamente, longitud de onda que corresponde al color rojo, que coincide con el color de la flor de *B. macrophylla* (Véase **Figura 3**).

En la **Tabla 10**, se muestran todos los compuestos identificados en los tres extractos obtenidos (SE, MSPD y SFE) de las flores de *B. macrophylla*, identificados por cromatografía de gases y líquida, acoplada a espectrometría de masas.

Tabla 10. Compuestos identificados en los extractos aislados de flores de *B. macrophylla*.

Compuesto	Fórmula	Método de extracción			Clasificación
		SE	MSPD	SFE	
Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-	-	+	AGS*
Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-	-	+	AGI**, C18:2
α-Ácido linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-	-	+	AGI**, C18:3
Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	-	-	+	Fitoesterol
γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	-	-	+	Fitoesterol
Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	-	-	+	Fitoesterol
Pelargonidina-3,5-diglucósido	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	+	+	-	Antocianina
Pelargonidina-3-glucósido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	+	+	-	Antocianina
Pelargonidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	+	-	-	Antocianidina
Peonidina	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	+	-	-	Antocianidina
Cianidina-3-rutinósido	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	-	+	-	Antocianina
Cianidina-3-glucósido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	+	+	-	Antocianina
Cianidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	+	+	-	Antocianidina
Rutina (Quercetina-3-rutinósido)	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	-	+	-	Flavonol
Quercetina-3-galactósido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-	+	-	Flavonol
Quercitrina (Quercetina-3-ramnosa)	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-	+	-	Flavonol
Galato de equigalocatequina	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₁	-	+	-	Flavanol

*AGS: ácido graso saturado.

**AGI: ácido graso insaturado.

3.6 Determinación de la capacidad antioxidante y del contenido total de fenoles

Se determinó la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles, por los métodos ORAC, ABTS^{•+} y Folin-Ciocalteu, respectivamente, de los extractos obtenidos con fluido supercrítico (SFE), por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), y el extracto hidro-etanólico (SE, experimento 4). La metodología de estos ensayos está descrita en las **Secciones 3.4, 3.5 y 3.6**, respectivamente. Los resultados de estos ensayos realizados a los extractos de flores de *B. macrophylla*, se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Capacidad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos de flores de *B. macrophylla*

Muestra	ORAC ($\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia)			ABTS ^{•+} ($\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia)			Folin-Ciocalteu (mg ácido gálico/g de sustancia)		
SE	670	±	6	710	±	8	9,7	±	0,5
MSPD	2900	±	50	1863	±	40	579	±	5
SFE	40	±	7	219	±	6	3,5	±	0,7
BHT	460	±	9	1800	±	149	27,2	±	0,2
α -Tocoferol	550	±	13	920	±	63	16,9	±	0,2

El extracto hidro-etanólico ($670 \pm 6 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g), medido por el ensayo ORAC, tiene un valor más alto de $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g en comparación con las sustancias de referencia (BHT y α -tocoferol). Caso contrario sucedió en el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, donde las sustancias de referencia presentaron mayor actividad en comparación con el extracto SE ($710 \pm 8 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g). En el ensayo ORAC, se realiza un mecanismo de transferencia de protón, en contraste con el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}, basado en un mecanismo de transferencia de electrones. Con base en los resultados obtenidos por estos ensayos, se puede deducir, que el extracto hidro-etanólico posee más compuestos susceptibles a transferencia de electrones que de protones, aunque estén en menor proporción que las sustancias de referencia.

Para el extracto aislado por MSPD, se obtuvieron valores $2900 \pm 50 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia en el ensayo ORAC, y $1863 \pm 40 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia, usando el método de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}. En ambos ensayos el extracto tuvo una actividad antioxidante mayor, que la de las sustancias de referencia (ORAC: BHT $460 \pm 9 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia, y α -tocoferol 550 ± 13

$\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia; ABTS⁺: BHT $1800\pm 149 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia, y α -tocoferol $920\pm 63 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia).

Los valores de $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia, hallados para el extracto MSPD, en comparación con el extracto hidro-etanólico, fueron más altos. Una posible explicación de esto, puede ser, que por la técnica MSPD se lograron obtener más compuestos de naturaleza fenólica que en el extracto hidro-etanólico (Véanse **Figuras 13 y 18**). Otra posible explicación para este aumento en dicha actividad biológica, puede ser, que en el extracto aislado por MSPD, se empleó como solvente de elución una mezcla de metanol:agua y en el extracto con solvente se usó una mezcla etanol:agua, como se explicó en la **Sección 4.5**, el metanol se considera un mejor solvente para la obtención de compuestos de naturaleza fenólica.

En el extracto SFE, los valores de actividad antioxidante (ORAC: $40\pm 7 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia y ABTS⁺: $219\pm 6 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia) fueron muy bajos en comparación con las sustancias de referencia, lo cual coincide con la naturaleza de los compuestos encontrados en el extracto. Como se muestra en la **Tabla 7**, los metabolitos identificados en dicho extracto son ácidos grasos y fitoesteres, sustancias similares al colesterol, con funciones estructurales y de soporte para la célula vegetal. Debido a que los compuestos identificados en el extracto SFE no tienen funciones de protección antioxidante, los valores de $\mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de sustancia de este extracto son bajos en comparación con los antioxidantes sintéticos, como se muestra en la **Tabla 11**.

Algunas características de estructura de los flavonoides, influyen favorablemente sobre la capacidad antioxidante de estos compuestos. Entre ellas figuran las siguientes: a) La presencia de un grupo catecol (*o*-dihidroxibenceno) en el anillo B, otorga una capacidad secuestradora de radicales; b) Un enlace doble C₂-C₃ en el anillo C le da estabilidad al flavonoide y aumenta la AA; c) La presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C en asociación con el doble enlace C₂-C₃ aumenta la actividad captadora de electrones deslocalizados del anillo B; d) La presencia de grupos hidroxilo o glúcidos en las posiciones 5 y 7 del anillo A, produce un aumento en la AA del flavonoide [87, 88].

Entre los compuestos identificados en el extracto por MSPD, se encuentran la quercitrina (quercetina-3-ramnósido), la rutina (quercetina-3-rutinósido) y quercetina-3-galactósido. Estas moléculas cumplen con las 4 características (Véase **Anexo 5**) descritas anteriormente para el aumento de la AA, y las cianidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido y cianidina, tienen 3 propiedades de

las 4 mencionadas. Entre los compuestos identificados en el extracto hidro-etanólico, que son cianidinas y pelargonidinas, estas últimas sólo poseen 2 características de las descritas en el párrafo anterior. Por lo cual, en el extracto aislado por MSPD, que posee más compuestos AH, se esperaría una AA mayor que en el extracto hidro-etanólico, lo cual concuerda con los resultados obtenidos (Véase **Tabla 11**).

El ensayo de Folin-Ciocalteu, mide la cantidad de compuestos fenólicos presentes en una muestra. En las tres muestras estudiadas en este trabajo (extractos SFE, MSPD y SE), se determinó por este ensayo el contenido fenólico. Era de esperarse que el extracto con mayor contenido de fenoles, fuese el extracto por MSPD, debido a que fue el extracto con mayor número de compuestos fenólicos encontrados. El extracto del que se esperaba menor contenido de fenoles era el obtenido por SFE, por la misma razón de su baja actividad antioxidante, y la naturaleza de los compuestos identificados. Estos pronósticos se confirmaron con la medición del contenido fenólico, que se expresa en mg ácido gálico/g sustancia, donde el extracto aislado por MSPD obtuvo un valor más alto, seguido del extracto hidro-etanólico, y por último, el extracto obtenido por SFE (Véase **Tabla 11**).

4 CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios presentes en extractos de flores de *B. macrophylla* se aislaron por las técnicas de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), extracción con solventes (SE) y extracción con fluido supercrítico (SFE).

La extracción con fluido supercrítico permitió obtener compuestos de naturaleza lipídica (fitoesteroles), a diferencia de las técnicas MSPD y SE, con las cuales se extrajeron compuestos fenólicos, *i.e.*, flavonoides.

El análisis por LC-ESI⁺-TOF-MS de los extractos obtenidos por MSPD y SE, mostró la presencia de compuestos fenólicos, tales como quercitrina, cianidinas, pelargonidinas, entre otros, responsables de la actividad antioxidante.

Por medio del ANOVA se encontró que las variables de relación etanol:agua (541.14), acidez (71.69) y temperatura (1630.14), presentaron efectos mayores en comparación al valor umbral (10.13); por lo tanto, estas variables influyen significativamente en la obtención de antocianinas monoméricas totales.

El extracto obtenido por MSPD presentó la capacidad antioxidante más alta (ORAC: $2900 \pm 50 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$; ABTS⁺: $1863 \pm 40 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$), según los ensayos evaluados, en comparación con los extractos aislados por SFE (ORAC: $40 \pm 7 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$; ABTS⁺: $219 \pm 6 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$) y SE (ORAC: $670 \pm 6 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$; ABTS⁺: $710 \pm 8 \mu\text{molTrolox}^{\text{®}}/\text{g}$); también tuvo el contenido fenólico mayor (MSPD: $579 \pm 5 \text{ mg ácido gálico/g}$, SE: $9.7 \pm 0.5 \text{ mg ácido gálico/g}$ y SFE: $3.5 \pm 0.7 \text{ mg ácido gálico/g}$). Esto muestra que, por MSPD se obtiene un número mayor de compuestos de naturaleza fenólica y antioxidante.

Se obtuvo la longitud de onda de absorción en el rango del visible, de los extractos por MSPD (λ : 509 nm) y SE (λ : 507 nm), por medio de espectroscopia UV-vis, relacionándose la longitud de onda con el color de la flor.

La mayoría de los compuestos fenólicos identificados en los extractos por MSPD y SE, son de naturaleza antocianina y se les atribuyen la actividad antioxidante encontrada en los extractos y la coloración de la flor.

5 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar diseño de experimentos para las extracciones, monitoreando más variables que influyan en la obtención y estabilización de los compuestos fenólicos, y utilizando como observables el contenido de antocianinas monoméricas, el contenido fenólico y la capacidad antioxidante por diferentes métodos.

Evaluar la estabilidad de los extractos coloreados y monitorear su degradación, con el propósito de obtener información útil para la formulación de productos a partir de ingredientes naturales.

Debido a que el extracto obtenido por MSPD, presentó valores de actividad antioxidante más altos y tenía más flavonoides, se sugiere usar esta técnica con diferentes solventes de elución, entre ellos, mezclas y/o solventes en máximo valor de pureza, variando la acidez, con el objetivo de optimizar las variables de extracción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. A. Gómez, D. J. Macías, “Fenología del Palo Cruz (*Brownea rosa-de-monte* Bergius) en un bosque seco de Bolivar, Cauca”, *Colombia Forestal*, Volumen 15, pág. 105-117, 2012.
- [2] V. Núñez, R. Otero, J. Barona, J. C. Quintana, A. Díaz, R. Fonnegra, S. Jiménez, R. G. Osorio, “La inhibición de los efectos tóxicos de *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Micrurus mipartitus* (venenos de serpiente) por extractos de plantas”, *Pharmaceutical Biology*, Volumen 42, pág. 49-54, 2004.
- [3] V. Núñez, R. Otero, J. Barona, R. Fonnegra, S. L. Jiménez, A. Díaz, R. G. Osorio, J. C. Quintana, “Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Volumen 37, pág. 969-977, 2004.
- [4] B. Pereira, J. Brazón, “Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system”, *Journal of Ethnopharmacology*, Volumen 160, pág. 6-13, 2015.
- [5] J. Pokorný, “Are natural antioxidants better-and-safer-than synthetic antioxidants?”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Volumen 109, pág. 629-642, 2007.
- [6] S. Sen, R. Chakraborty, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, B. De, “Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Volumen 3, pág. 91-100, 2010.
- [7] R. Otero, V. Núñez, J. Barona, R. Fonnegra, S. L. Jiménez, R. G. Osorio, M. Saldarriaga, A. Díaz, “Snakes and ethonobotany in the northwest region of Colombia”, *Journal of Ethnopharmacology*, Volumen 73, pág. 233-241, 2000.
- [8] J.F. Gil, M. Gómez, J. Trejos, “Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de *Brownea ariza* Brenth”, *Revista de la facultad de química farmacéutica-Universidad de Antioquia*, Volumen 16, pág. 93-101, 2009.
- [9] L. J. Lizcano, F. Bakkali, M. B. Ruíz, J. I Ruíz, “Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use”, *Journal of Food Chemistry*, Volumen 119, pág. 1566-1570, 2010.

- [10] V. L. Mack-Wen, L. B. Rico, J. C. Alarcón, J. A. Pereañez, "Inhibición *in vitro* del veneno de *Bothrops asper* con extractos etanólicos de *Brownea ariza* (CAESALPINIACEAE)", *Revista de la facultad de química farmacéutica-Universidad de Antioquia*, Volumen 18, pág. 43-48, 2010.
- [11] A. Sampedro, A. Álvarez, L.M. Domínguez, I. Herrera, "Especies promisorias para el ecoturismo en Campo Aventura Roca Madre, Toluviejo-Sucre, Colombia", *Revista científica de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad de Córdoba*, Volumen 18, pág. 3387-3398, 2011.
- [12] L. J. Lizcano, M. Vilorio, F. Vicente, L. A. Berrueta, B. Gallo, M. Martínez, M. M. Ruiz, J. J. Ruiz, "Lipid Oxidation Inhibitory Effects and Phenolic Composition of Aqueous Extracts from Medicinal Plants of Colombian Amazonia", *International Journal of Molecular Sciences*, Volumen 13, pág. 5454-5467, 2012.
- [13] B. Pereira, J. Brazón, "Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system", *Journal of Ethnopharmacology*, Volumen 160, pág. 6-13, 2015.
- [14] National Academy of Sciences, "TROPICAL LEGUMES, Resources for the future", Library of Congress, Catalog Number 79-64185, pág. 244-245, 1979, Washington, EE. UU.
- [15] F. D. Rauch, P. R. Weissich, "Small trees for the tropical landscape" Editorial Everbest Printing CO., Ltd, pág.18, 2009, Hawaii, EE.UU.
- [16] J. Morera, C. Umaña. "Programa agricultura tropical sostenible unidad recursos filogenéticos jardín botánico cabiria-7", Editorial CATIE, pág. 9, 1995, Turrialba, Costa Rica, ISBN 9977-57-207-0.
- [17] D. B. Haytowitz, S. Bhagwat, "USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2", *Agricultural Research Service*, Volumen 1, pág. 1-46, 2010.
- [18] M. Avello, R. Valdivia, R. Sanzana, M. A. Moncada, S. Mennickent, V. Aeschliman, M. Bittner, J. Becerra, "Extractos antioxidantes y antimicrobianos de *Aristolelia chilensis* y *Ugni molinae* y sus aplicaciones como preservantes en productos cosméticos", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Volumen 6, pág. 479-486, 2009.
- [19] M. D. Reboiras, "Química, la ciencia básica", Editorial Thomson, pág. 605-607, 2005, España, ISBN 8497323475.

- [20] D. Festy, "Antioxidantes: guía práctica", Editorial Robinbook, pág. 19-26, 2007, Barcelona, España, ISBN 9788479278816.
- [21] H. K. Biesalski, P. Grimm, "Nutrición, texto y atlas", Editorial panamericana, pág. 206, 2009, Madrid, España, ISBN 978-84-9835-040-1.
- [22] P. Abizanda, L. Romero, C. Luengo, P. M. Sánchez, J. J. Bueso, "Medicina geriátrica: una aproximación basada en problemas", Editorial MASSON, pág. 1-405, 2012, Barcelona, España, ISBN 978-84-458-2184-8.
- [23] P.K. Wanasundara, F. Shahidi, "Antioxidants: Science, Technology, and Applications", *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Volumen 1, pág. 1-11, 2015.
- [24] L. P. Case, D. P. Carey, "Nutrición Canina y Felina", Editorial Harcourt, pág. 234, 2005, Madrid, España, ISBN 84-8174-551-0.
- [25] K. Goodburn, "EU food law: a practical guide", Editorial *Woodhead Publishing*, pág. 77, 2011, Boca Raton, EE.UU.
- [26] OMS, "Leche y productos lácteos", *Codex Alimentarius*, pág. 23, 2011, Roma, Italia, ISBN 978-92-5-305837-2.
- [27] B. Ou, M. Hampsch, R. L. Prior, "Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volumen 49, pág. 4619-4626, 2001.
- [28] P. Sánchez, M. Rodríguez, C. Bailón, J. Garzón, "GPCRs Promote the Release of Zinc Ions Mediated by nNOS/NO and the Redox Transducer RGSZ2 Protein", *Antioxid Redox Signal*, Volumen 9, pág. 1163-1177, 2012.
- [29] T. M. Devlin, "Bioquímica", Editorial Reverté, cuarta edición, pág. 592, 2004, Barcelona, España, ISBN, 84-291-7208-4.
- [30] S. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Know, J. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. Dutta, M. Levine, "Vitamin C as an Antioxidant: evaluation of its role in disease prevention", *The Journal of American College of Nutrition*, Volumen 22, pág. 18-35, 2003.
- [31] M. G. Traber, J. Atkinson, "Vitamin E, Antioxidant and Nothing More", *Free Radical Biology & Medicine*, Volumen 43, pág. 4-15, 2007.

- [32] G. A. Armstrong, J.E. Hearst, "Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis", *Federation of American Societies for Experimental Biology*, Volumen 10, pág. 228-237, 1996.
- [33] J. G. Handique, J. B. Baruah, "Polyphenolic compounds: an overview", *Reactive & Functional Polymers*, Volumen 52, pág. 163-188, 2002.
- [34] K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover, "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits", *Food Chemistry*, Volumen 66, pág. 401-436, 1999.
- [35] R. R. Watson, "Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation", Editorial *Elsevier*, pág. 75-78, 2014, Tucson, EE.UU., ISBN: 978-0-12-397934-6.
- [36] O. M. Andersen, K. R. Markham, "Flavonoids: chemistry, biochemistry and application", Editorial Taylor & Francis, pág. 1197, 2006, Boca Ratón, EE.UU.
- [37] J. Xiao, T. Chen, H. Cao, "Flavonoid glycosylation and biological benefits", *Biotechnology Advances*, Volumen 14, pág. 1145-1156, 2014.
- [38] D. Ravishakar, A. Kumar, F. Greco, H. Osborn, "Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volumen 45, pág. 2821-2831, 2013.
- [39] W. G. Murrel, W. J. Scott, "The Heat Resistance of Bacterial Spores at Various Water Activities", *Journal of General Microbiology*, Volumen 43, pág. 411-425, 1966.
- [40] J. A. Erlandson, R. E. Wrolstad, "Degradation of anthocyanins at limited water concentration", *Journal of Food Science*, Volumen 37, pág. 592-595, 1972.
- [41] N. Jiménez, P. Bohuon, M. Dornier, C. Bonazzi, A. M. Pérez, F. Vaillant, "Effect of water activity on anthocyanin degradation and browning kinetics at high temperatures (100-140 °C)", *Journal of Food Research International*, Volumen 47, pág. 106-115, 2012.
- [42] J. Alvarado, "Ensayos de almacenamiento y estudio de un mecanismo de secado a temperaturas bajas en papa (*Solanum tuberosum*)", Tesis para optar por el título de Magíster, CESNA-INCAP, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, pág. 68-70, 1979.

- [43] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Lagana, "Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction", *Journal of Chromatography A*, Volumen 1217, pág. 2521-2532, 2010.
- [44] S. Barker, "Matrix solid-phase dispersion", *Journal of Chromatography*, Volumen 885, pág. 115-127, 2000.
- [45] E. de Rijke, P. Out, W. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U. Brinkman, "Analytical separation and detection methods for flavonoids", *Journal of Chromatography A*, Volumen 1112, pág. 31-63, 2006.
- [46] H. Zhang, M. Kang, H. Zhang, Y. Yu, "Matrix solid phase dispersion extraction for determination of flavonoids in the flower of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. by capillary zone electrophoresis", *Analytical Methods*, Volumen 6, pág. 766-773, 2014.
- [47] M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibáñez, "Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food", *Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Volumen 4, pág. 159-180, 2012.
- [48] D. Ndiomu, C. Simpson, "Some applications of supercritical fluid extraction", *Analytica Chimica Acta*, Volumen 213, pág. 237-243, 1988.
- [49] G. Ohloff, "Importance of minor components in flavors and fragrances", *Perfumer and Flavorist*, Volumen 3, pág. 11-22, 1978.
- [50] M. Durante, M. Salvatore, G. Mita, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Pumpkin (*Cucurbita* spp.): A Review", *International Journal of Molecular Sciences*, Volumen 15, pág. 6725-6740, 2014.
- [51] S. Li, L. Guo, C. Liu, Z. Fu, Y. Zhang, "Combination of supercritical fluid extraction with counter-current chromatography to isolate anthocyanidins from the petals of *Chaenomeles sinensis* based on mathematical calculations", *Journal of Separation Sciences*, Volumen 36, pág. 3517-3536, 2013.
- [52] N. Walton, D. Irown, "Chemicals from plants: Perspectives on plants secondary products", Editorial *Imperial Collegue-Londres*, pág 95-113, 1999, Londres, Inglaterra, ISBN 9810227736.
- [53] A. Ibars, G. Barbosa, "Operaciones unitarias en ingeniería de alimentos", Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España, pág. 767-770, 2005.

- [54] D. B. Haytowitz, S. Bhagwat, "USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2", *Agricultural Research Service*, Volumen 1, pág. 1-46, 2010.
- [55] E. M. Kuskoski, A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho, R. Fett, "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Volumen 25, pág. 726-732, 2005.
- [56] J. M. Obón, M. R. Castellar, J.A. Cascales, J. A. Fernández, "Assesment of the TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants", *Food Research International*, Volumen 38, pág. 843-845, 2005.
- [57] A. Pannala, T. S. Chan, P. J. O'Brien, C. A. Rice-Evans, "Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volumen 282, pág. 1161-1168, 2001.
- [58] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay", *Free Radical Biology & Medicine*, Volumen 26, pág. 1231-1237, 1999.
- [59] S. Martínez, J. González, J. M. Culebras, M. J. Tuñón, "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", *Nutrición Hospitalaria*, Volumen 17, pág. 271-278, 2002.
- [60] R. Julkuenen, "Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 33, pág. 213-217, 1985.
- [61] A. Zuleta, M. J. Esteve, A. Frígola, "ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products", *Food Chemistry*, Volumen 114, pág. 310-316, 2009.
- [62] E. Stashenko, J. R. Martínez, "Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas", *Scientia Chromatographica*, Volumen 2, pág. 29-47, 2010.
- [63] E. Stashenko, J. R. Martínez, "GC y GC-MS: Configuración del equipo versus aplicaciones", *Scientia Chromatographica*, Volumen 2, pág. 23-46, 2010.
- [64] NIST Chemistry WebBook, base de datos, consultado: 22 de mayo de 2016, disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

- [65] A. C. Alberts, T. R. Sharp, D. I. Werner, P. J. Weldon, "Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green Iguanas (*Iguana iguana*)", *Journal of Chemical Ecology*, Volumen 18, pág. 703-712, 1992.
- [66] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, "Fundamentos de química analítica", Editorial CENGAGE Learning, Novena edición, pág. 912-921, Ciudad de México, México, ISBN 978-607-519-937-6.
- [67] R. Tsao, Z. Deng, "Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals", *Journal of Chromatography B*, Volumen 812, pág.85-99, 2004.
- [68] H. M. Merken, G. R. Beecher, "Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 48, pág. 577-579, 2000.
- [69] A. Castañeda, M. Pacheco, E. Páez, J. Rodríguez, C. Galán, "Chemical studies of anthocyanins: A review", *Food Chemistry*, Volumen 113, pág. 859-871, 2009.
- [70] M. Naczek, F. Shahidi, "Extraction and analysis of phenolics in food", *Journal of Chromatography A*, Volumen 1054, pág. 95-111, 2004.
- [71] M. Giusti, R. Wrolstad, "Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Volumen 5, pág. 1-13, 2001.
- [72] H. B. Xiao, M. Krucker, K. Albert, X. M. Liang, "Determination and identification of isoflavonoids in *Redix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection", *Journal of Chromatography A*, Volumen 1032, pág. 117-124, 2004.
- [73] J. Paes, R. Dotta, G. F. Barbero, J. Martínez, "Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids", *Journal of Supercritical Fluids*, Volumen 95, pág. 8-16, 2014.
- [74] S. Ersus, U. Yurdagel, "Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier", *Journal of Food Engineering*, Volumen 80, pág. 805-812, 2007.

- [75] L. M. Magalhaes, F. Santos, M. A. Segundo, S. Reis, J. L. F. C. Lima, "Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity", *Talanta*, Volumen 83, pág. 441-447, 2010.
- [76] R. P. Adams, "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry", Editorial Allured Publishing Corporation, Cuarta edición, pág 1-804, 2004, Illinois, EE.UU., ISBN 1932633219.
- [77] H. van Den Dool, P. Dec. Kratz, "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography", *Journal of Chromatography A*, Volumen 11, pág. 463-471, 1963.
- [78] T. Vatai, M. Skerget, Z. Knez, "Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide", *Journal of Food Engineering*, Volumen 90, pág. 246-254, 2009.
- [79] V. I. Babushok, P. J. Linstrom, I. G. Zenkevich, "Retention indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils", *Journal of Physical Chemistry*, Volumen 40, pág. 43101:1-43101:47, 2011.
- [80] I. M. Aparicio, A. Redondo, M. J. Villanueva, M. A. Zapata, "Soybean, a promising health source", *Nutrición Hospitalaria*, Volumen 23, pág. 305-312, 2008.
- [81] S. C. Benoit, C. J. Kemp, C. F. Elias, W. Abplanalp, J. P. Herman, S. Migrenne, A. Lefevre, C. Guglielmacci, C. Magnan, F. Yu, K. Niswender, B. G. Irani, W. L. Holland, D. J. Clegg, "Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents", *The Journal of Clinical Investigation*, Volumen 199, pág. 2577-2587, 2009.
- [82] F. Q. Wang, K. Yao, D. Z. Wei, "From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones", *Agricultural and Biological Sciences*, Volumen 1, pág. 231-252, 2011.
- [83] M. Aguilera, M. Reza, R. G. Chew, J. A. Meza, "Propiedades funcionales de las antocianinas", *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, Volumen 2, pág. 16-22, 2001.
- [84] C. M. Galanakis, V. Goulas, S. Tsakona, G. A. Manganaris, V. Gekas, "A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents", *International Journal of Food Properties*, Volumen 16, pág. 382-396, 2013.
- [85] D. H. Wester, "Sur Les Constituants Chimiques de Quelques Loranthacées", *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, Volumen 40, pág. 707-723, 1921.

[86] A. Martínez M., “Flavonoides”, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, pág 21-24, 2005, Medellín, Colombia.

[87] A. R. Tapas, D. M. Sakarkar, R. B. Kakde, “Flavonoids as Nutraceuticals: A Review”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Volumen 7, pág. 1089-1099, 2008.

[88] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, “Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids”, *Free Radical & Medicine*, Volumen 20, pág. 933-956, 1996.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. P., "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry", Editorial Allured Publishing Corporation, Cuarta edición, pág 1-804, 2004, Illinois, EE.UU., ISBN 1932633219.

Barker, S.; "Matrix solid-phase dispersion", *Journal of Chromatography*, Volumen 885, pág. 115-127, 2000.

Ersus, S.; Yurdagel, U.; "Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier", *Journal of Food Engineering*, Volumen 80, pág. 805-812, 2007.

Giusti, M.; Wrolstad, R.; "Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Volumen 5, pág. 1-13, 2001.

Gómez, D. A.; Macías, D. J.; "Fenología del Palo Cruz (*Brownea rosa-de-monte* Bergius) en un bosque seco de Bolivar, Cauca", *Colombia Forestal*, Volumen 15, pág. 105-117, 2012.

Magalhaes, L. M.; Santos, F.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C.; "Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity", *Talanta*, Volumen 83, pág. 441-447, 2010.

Ou, B.; Hampsch, M.; Prior, R. L.; "Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volumen 49, pág. 4619-4626, 2001.

Paes, J.; Dotta, R.; Barbero, G. F.; Martínez, J.; "Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids", *Journal of Supercritical Fluids*, Volumen 95, pág. 8-16, 2014.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay", *Free Radical Biology & Medicine*, Volumen 26, pág. 1231-1237, 1999.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; "Fundamentos de química analítica", Editorial CENGAGE Learning, Novena edición, pág. 912-921, Ciudad de México, México, ISBN 978-607-519-937-6.

Stashenko, E.; Martínez, J. R.; “Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas”, *Scientia Chromatographica*, Volumen 2, pág. 29-47, 2010.

Stashenko, E.; Martínez, J. R.; “GC y GC-MS: Configuración del equipo *versus* aplicaciones”, *Scientia Chromatographica*, Volumen 2, pág. 23-46, 2010.

Van Den Dool, H.; Kratz, P. Dec.; “A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography”, *Journal of Chromatography A*, Volumen 11, pág. 463-471, 1963.

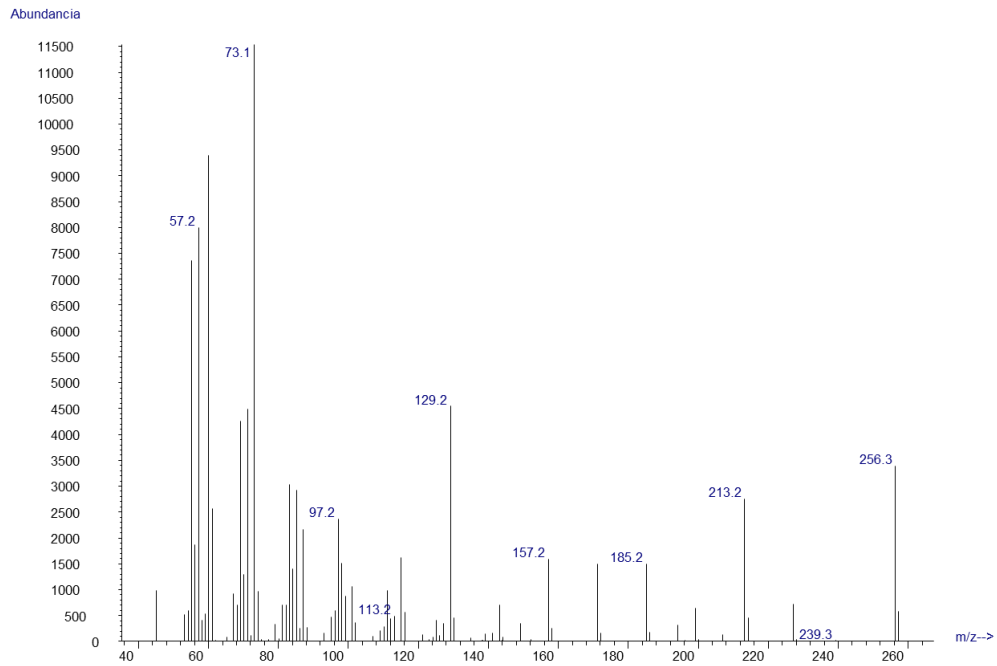
Wanasundara, P.K.; Shahidi, F.; “Antioxidants: Science, Technology, and Applications”, *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, Volumen 1, pág. 1-11, 2015.

Xiao, H. B.; Krucker, M.; Albert, K.; Liang, X. M.; “Determination and identification of isoflavonoids in *Redix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection”, *Journal of Chromatography A*, Volumen 1032, pág. 117-124, 2004.

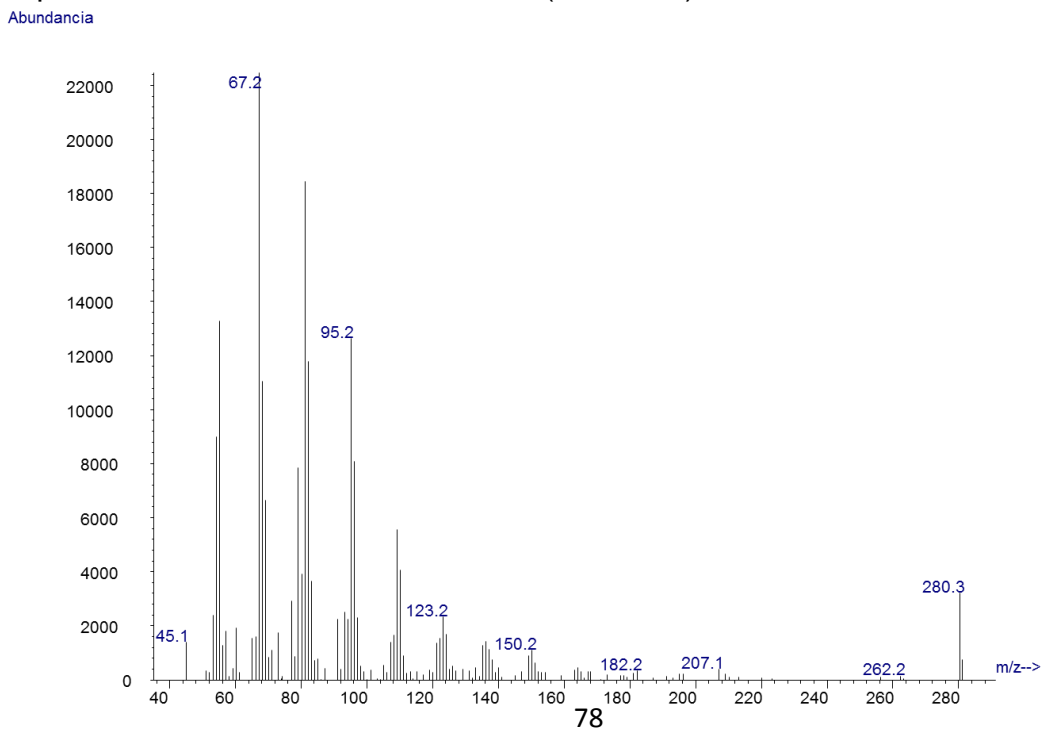
ANEXO A:

Espectros de masas de los compuestos identificados en el extracto por SFE de flores de *B. macrophylla*

Espectro de masas del ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$)



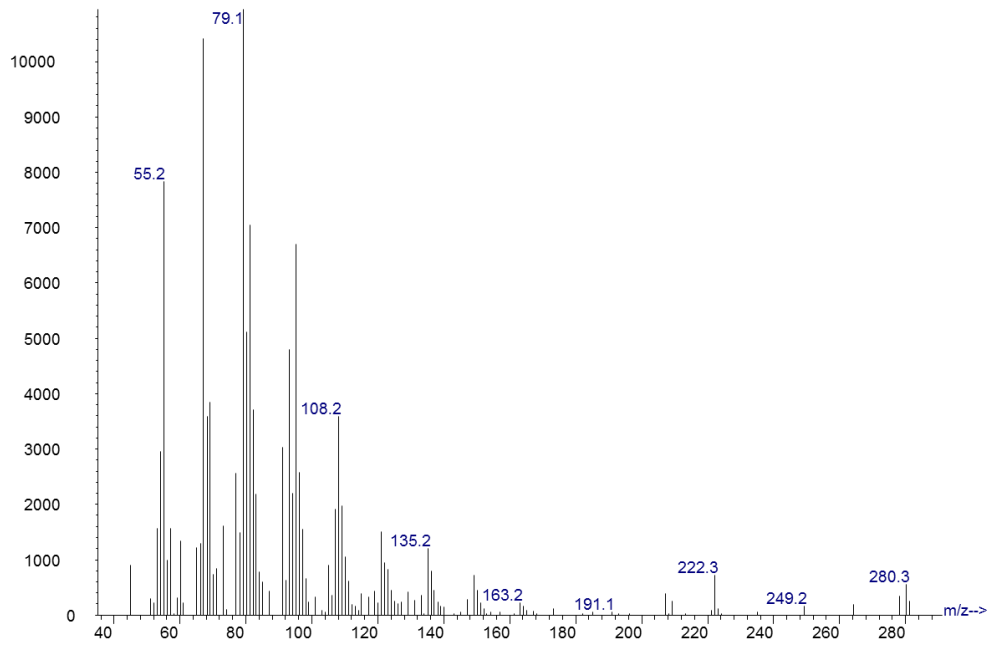
Espectro de masas del ácido linoleico ($C_{18}H_{32}O_2$)



Anexo A. Continuación.

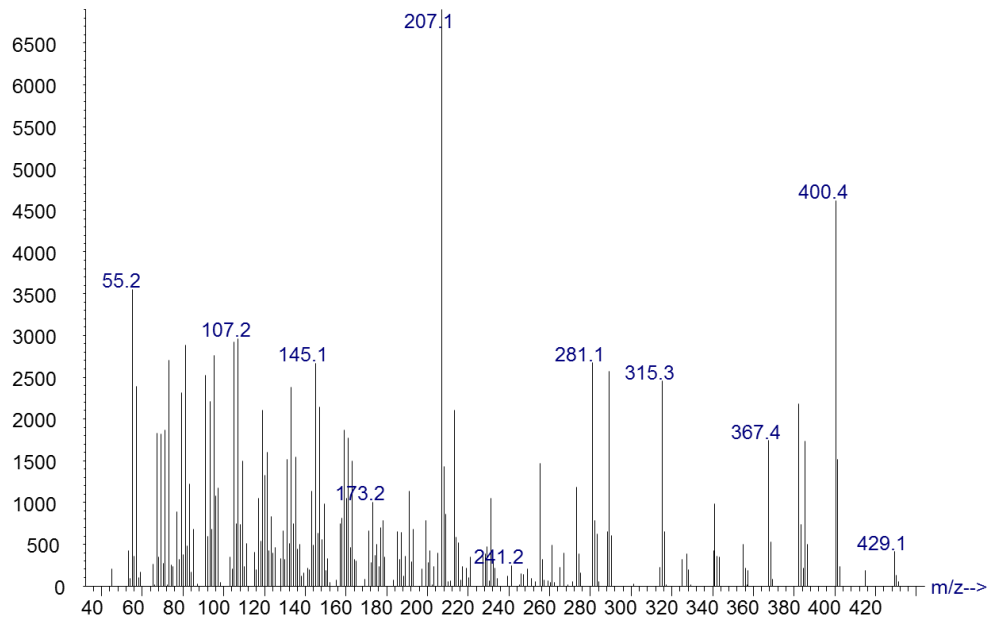
Espectro de masas del ácido linolénico ($C_{18}H_{30}O_2$)

Abundancia



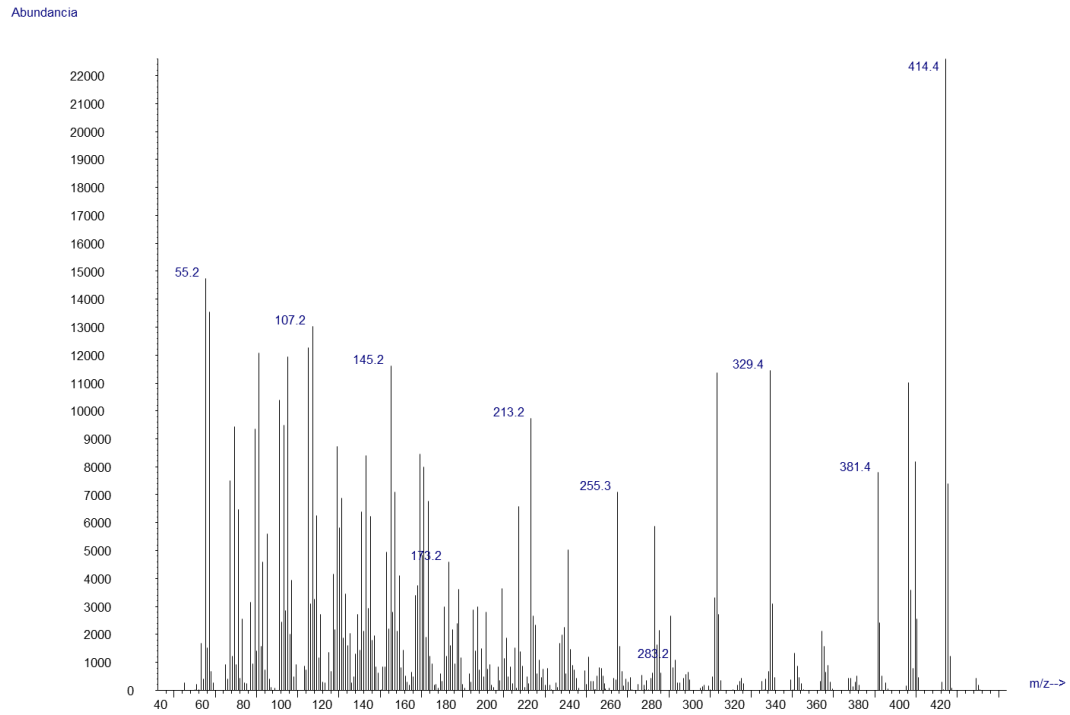
Espectro de masas del campesterol ($C_{28}H_{48}O$)

Abundancia

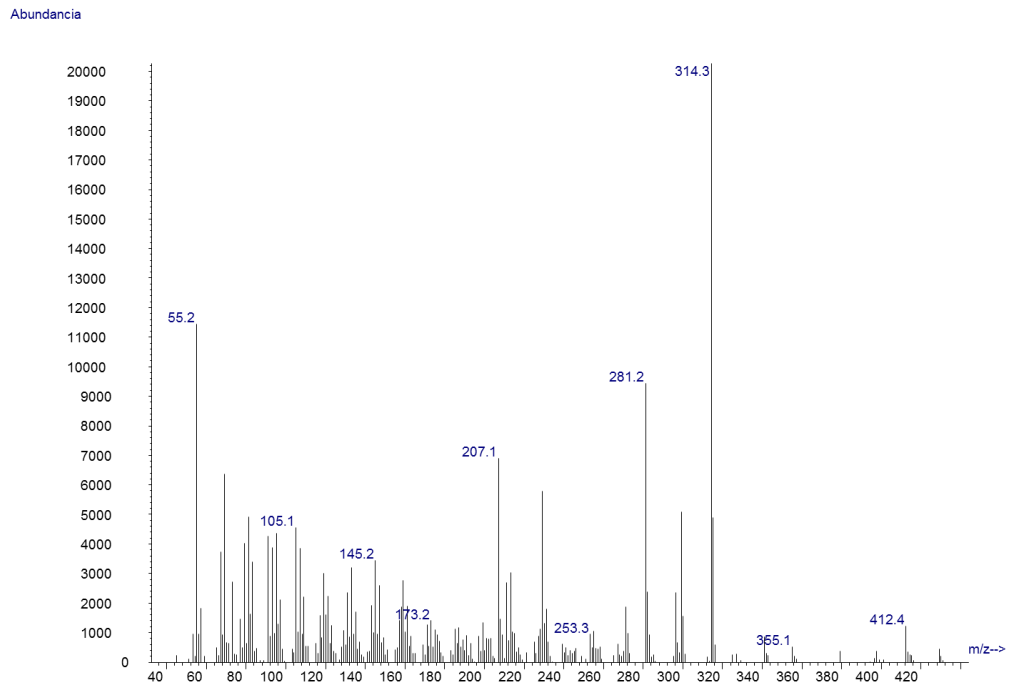


Anexo A. Continuación.

Espectros de masas del γ -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$)



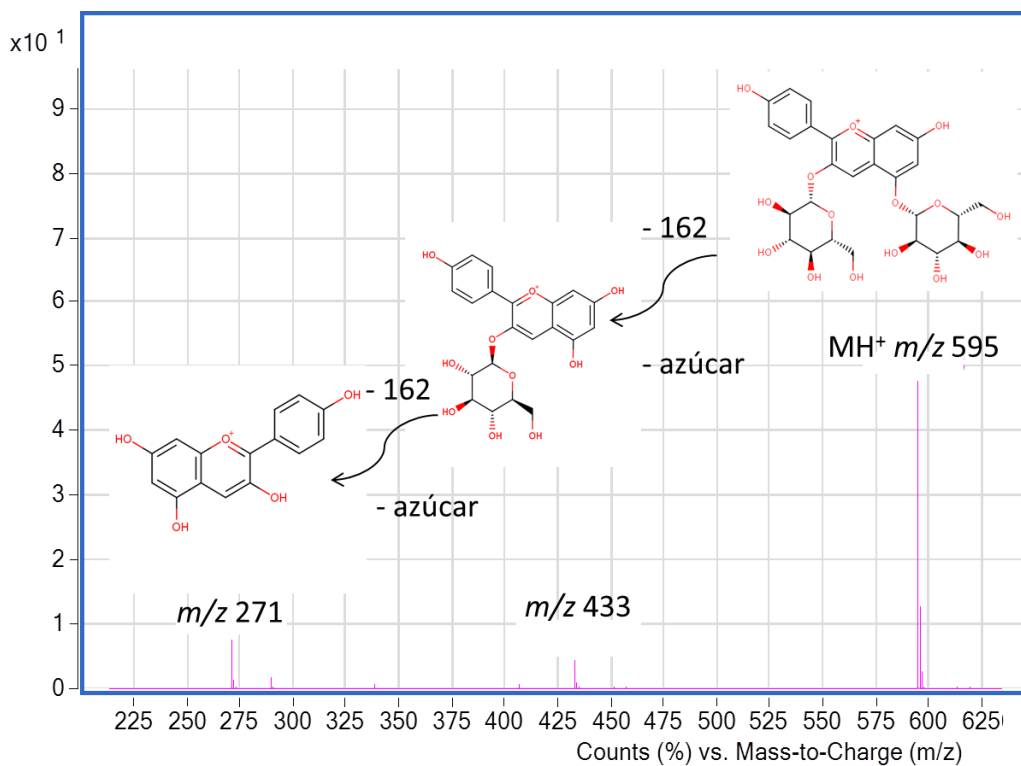
Espectro de masas del fucosterol ($C_{29}H_{48}O$)



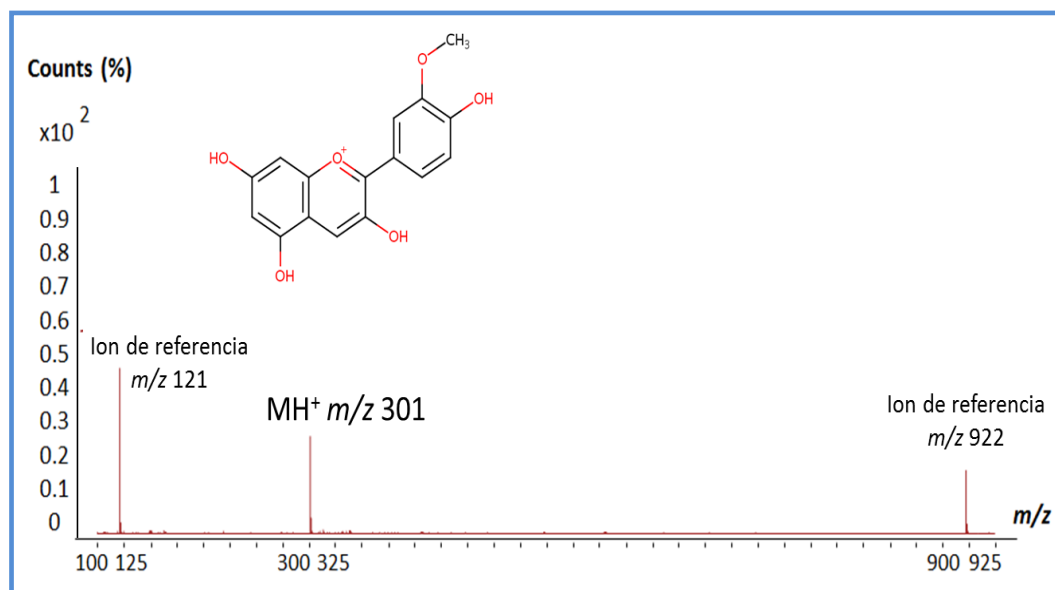
ANEXO B:

Espectros de masas de los compuestos identificados tentativamente en el extracto hidro-etanólico de flores de *B. macrophylla*.

Espectro de masas de la pelargonidina-3,5-diglucósido



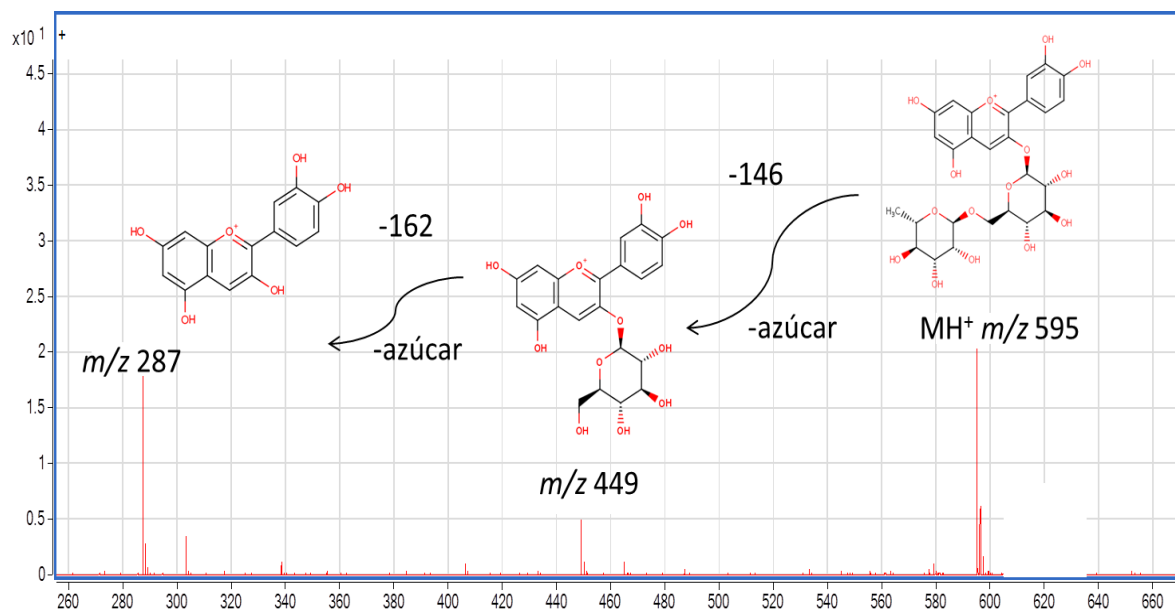
Espectro de masas de la peonidina



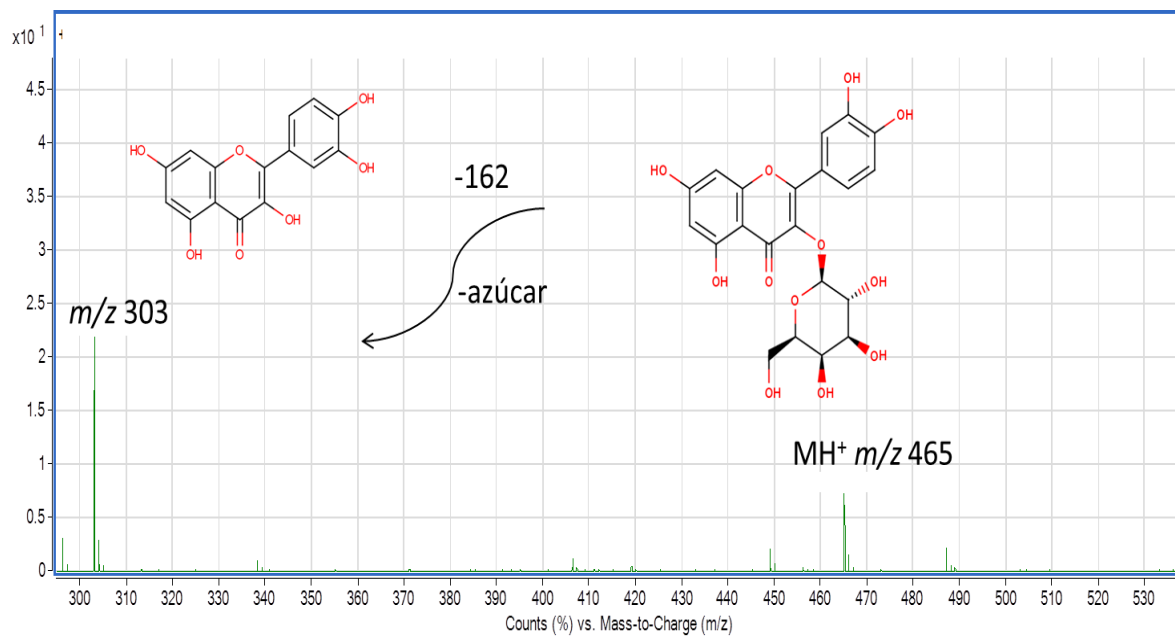
ANEXO C:

Espectros de masas de los compuestos identificados tentativamente en el extracto por MSPD de flores de *B. macrophylla*.

Espectro de masas de la cianidina-3-rutinósido.

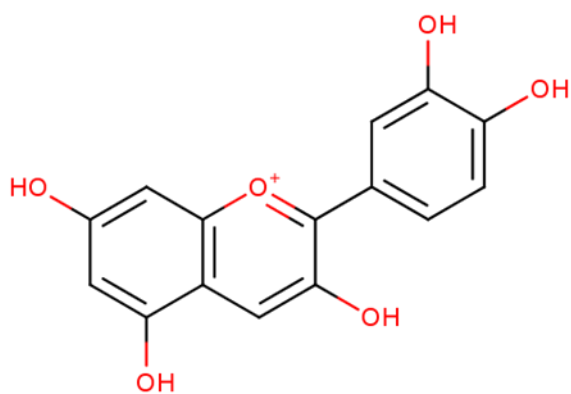


Espectro de masas de la quercetina-3-galactósido.

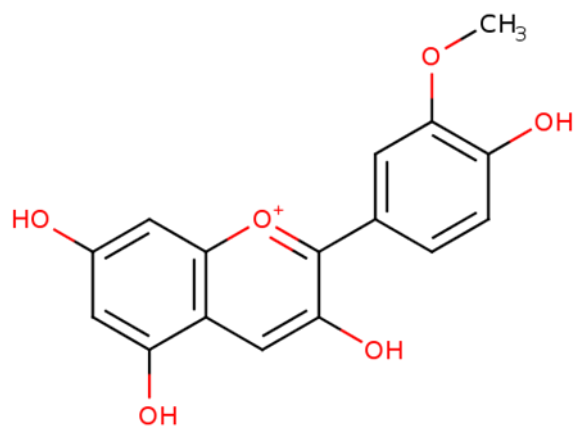


ANEXO D:

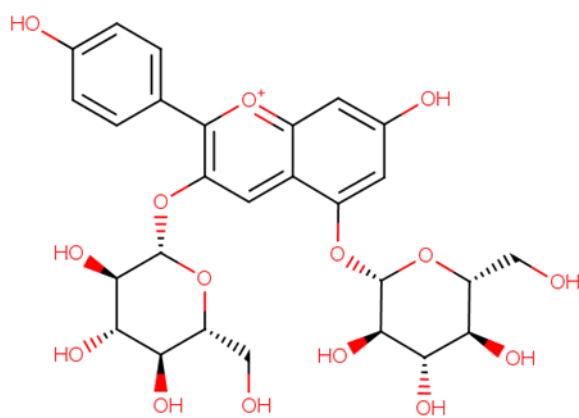
Flavonoides identificados en el extracto hidro-etanólico de flores de *B. macrophylla*.



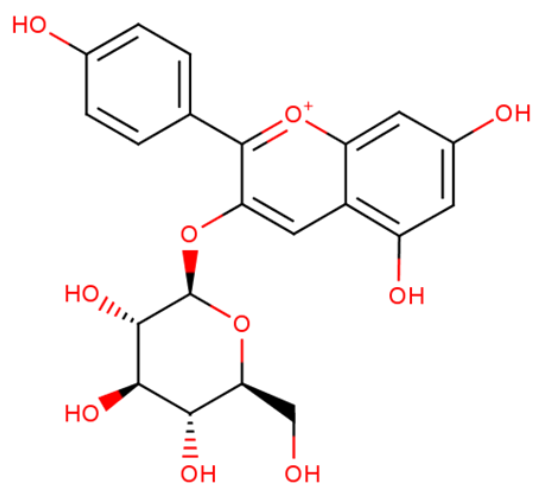
Cianidina



Peonidina

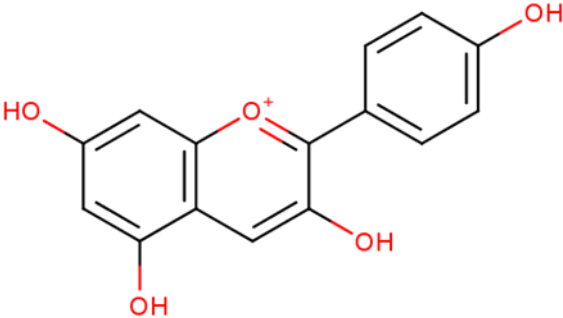


Pelargonidina-3,5-diglucósido

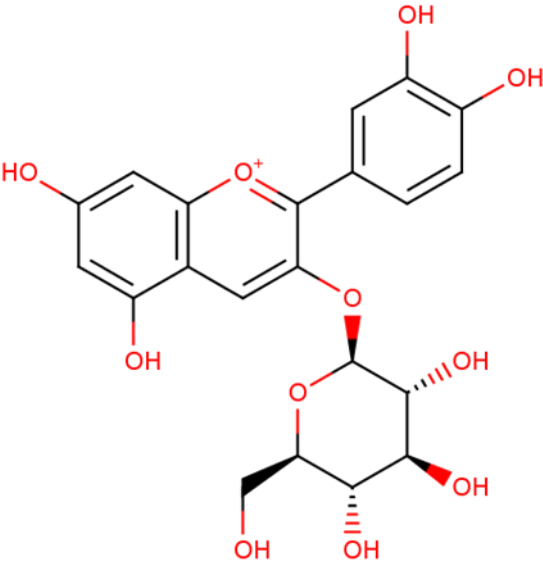


Pelargonidina-3-glucósido

Anexo D. Continuación.



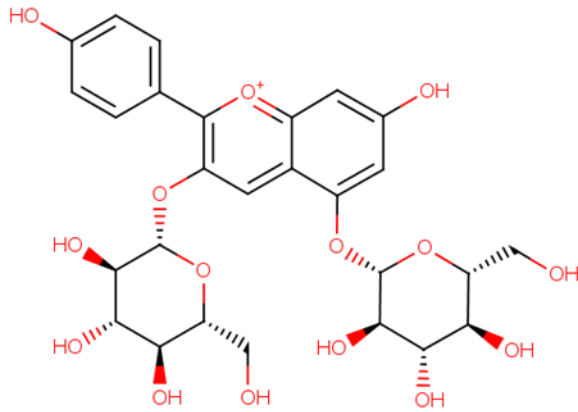
Pelargonidina



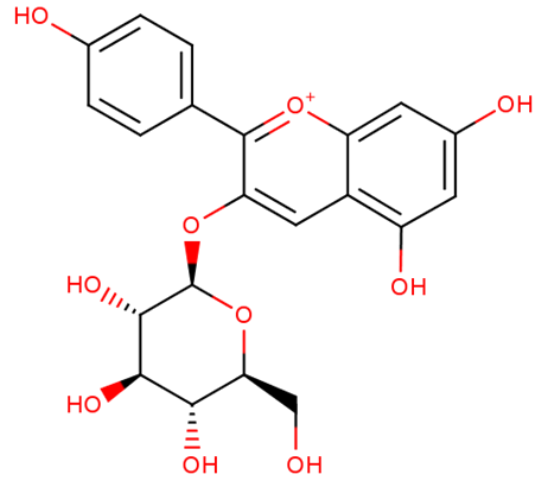
Cianidina-3-glucósido

ANEXO E:

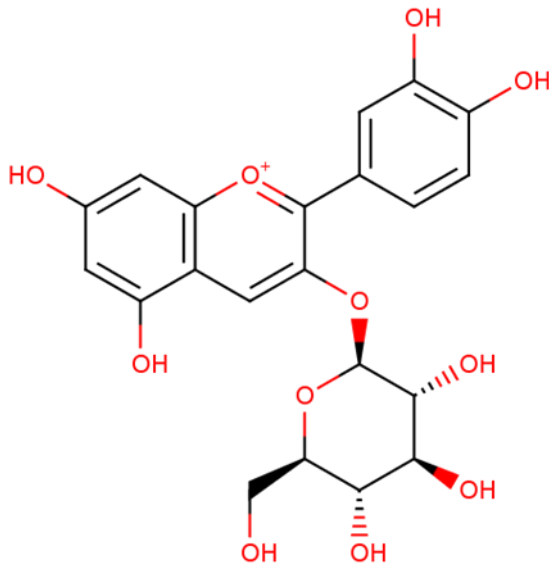
Flavonoides identificados en el extracto por dispersión de la matriz en fase sólida de flores de *B. macrophylla*.



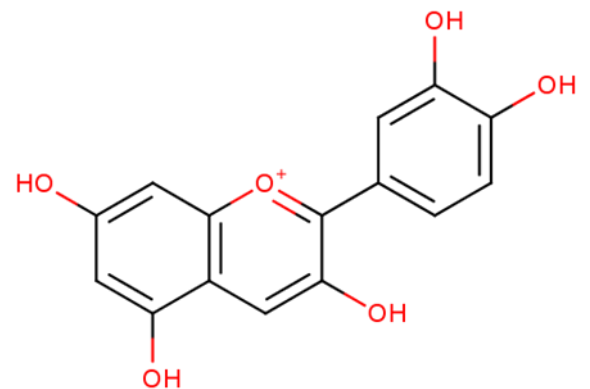
Pelargonidina-3,5-diglucósido



Pelargonidina-3-glucósido

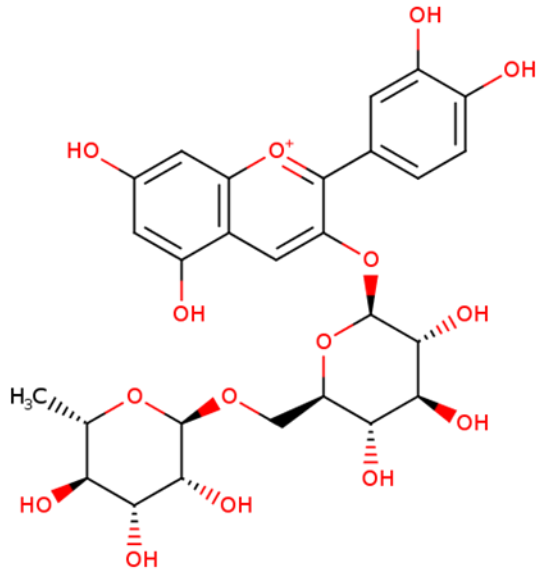


Cianidina-3-glucósido

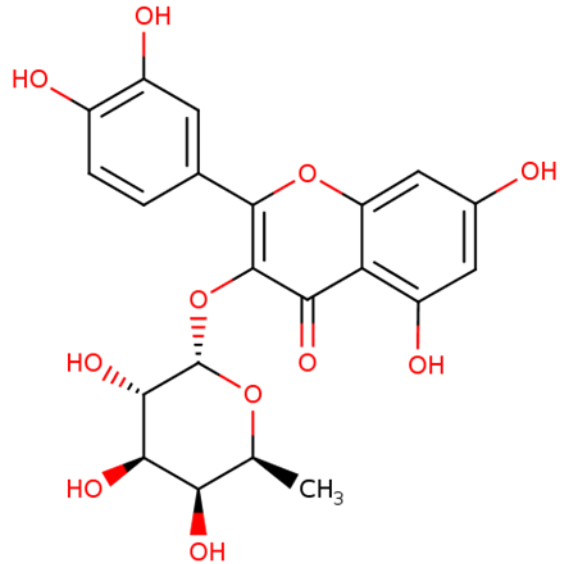


Cianidina

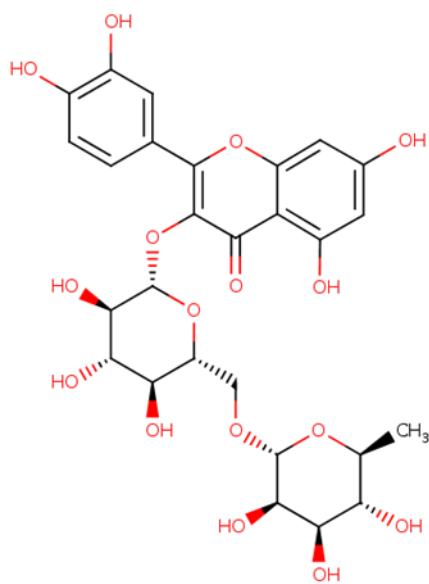
Anexo E. Continuación.



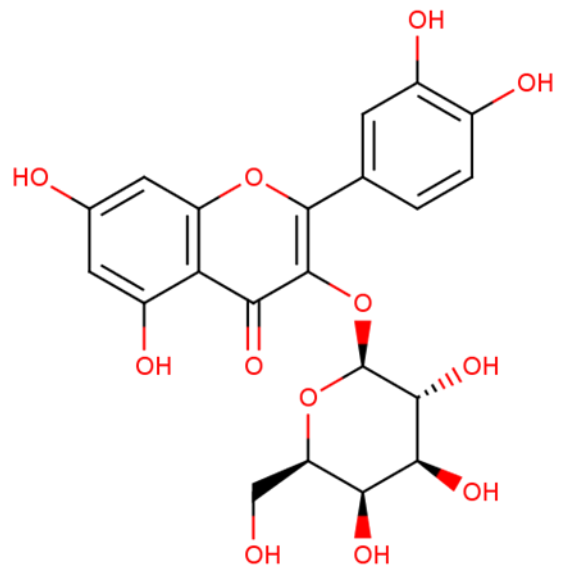
Cianidina-3-rutinósido



Quercitrina (Quercetina-3-ramnósido)

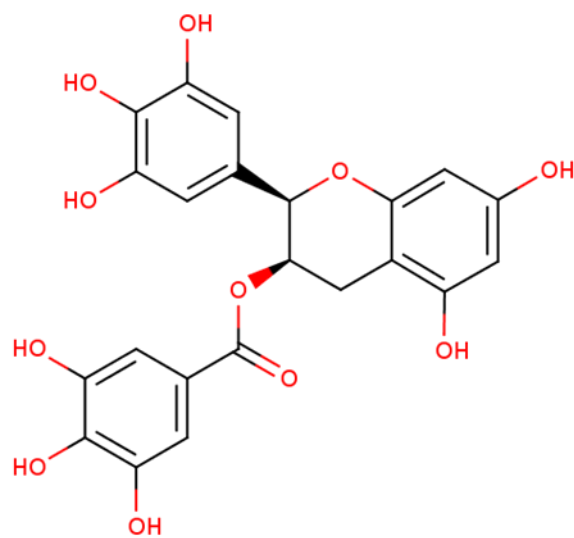


Rutina (Quercetina-3-rutinósido)



Quercetina-3-galactósido

Anexo E. Continuación.



Galato de epigalocatequina